E 1330
F

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 13

1970

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 1, p. 1—108, Bucureşti, martie, 1970

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin CARTIMEX, Căsuţa poştală 134—135, Bucureşti, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

ADRESA REDACŢIEI:
Bucureşti, Str. Docenţilor nr. 20
Sectorul I

E 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

BIBLIOTECA CENTRALĂ A ACADEMIEI R.S.R.

Tomul 13, nr. 1 1970

SUMAR

Pag.

S. OERIU, B. MĂNESCU, Influenţa grupărilor tiolice asupra vitezei de germinare şi asupra proceselor metabolice din seminţele de legume normal şi greu germinabile 5

H. ARAŢEI, ALICE KAPRI, Acţiunea unor reactivi chimici asupra proteinelor celulare în procesul fixării. II. Date cantitative cu privire la acţiunea fixatorilor Carnoy, formol şi alcool-formol asupra aminoacizilor liberi şi hidrolizatului proteic 9

CORINA BILAUS, ELENA NICOARĂ, C. BODEA, I. PETRESCU, Studiul comparativ, pe organe şi sexe, al carotinoidelor din *Macropipus holsatus* 15

I. BRAD, ZOIŢA MARCU, GH. OLTEANU, ELENA MOLDOVEANU, Diferenţieri ale izoperoxidazelor după variaţia activităţii lor în funcţie de concentraţia substratelor 19

A. BUSUIOC, C. COTRUŢ, Influenţa ionului de magneziu asupra activităţii pirofosfatazei anorganice din ficatul de şobolan 25

MIOARA CÂRSTEANU, Exosmoza aminoacizilor liberi din pielea vertebratelor în scara filogenetică 31

ELENA HADARAG, Acţiunea inhibitoare a ionilor de litiu asupra activităţii pirofosfatazei 37

IOANA HAGIMA-CĂLIN, Peroxidaza din porumb în primele etape de creştere . . 47

A. MOTAHARI, A. KECHTKAR, Schimbarea şi transformarea coloranţilor din alimente 55

G. NEAMŢU, C. BODEA, Cercetări chemotaxonomice la plantele superioare. III. Pigmenţii carotinoidici din vîsc (*Viscum album* L.) 59

ELENA NICOARĂ, CORINA BILAUS, C. BODEA, I. PETRESCU, Carotinoidele din *Carcinus mediterraneus* 65

EUG. PĂUNESCU, I. POPESCU, ANETA ŞERBESCU, Prepararea unei tuberculoproteine marcate cu ^{131}I şi dotate cu o înaltă specificitate imunologică . . 69

M. PECEC, Metodă experimentală pentru determinarea K_0 folosind antigene insolubilizate (imunosorbenţi, celule) 75

M. ŞERBAN, ELENA PRAHOVEANU, Izoenzimele şi activitatea lacticodehidrogenazei din serul iepurilor inoculaţi cu dermovaccină 79

REFERAT GENERAL

M. V. IONESCU, Antibioticele din plantele superioare 85

RECENZII 103

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 1, p. 1—108, Bucureşti, martie, 1970

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tome 13, No. 1 1970

CONTENTS

page

S. OERIU, B. MĂNESCU, The influence of thiolic groups on the germination rate and on the metabolic processes of normal and hardly germinated leguminous seeds 5

H. ARAŢEI, ALICE KAPRI, The action of some chemical reagents on cell proteins in the fixation process. II 9

CORINA BILAUS, ELENA NICOARĂ, C. BODEA, I. PETRESCU, Comparative study, by organs and sexes, of carotenoids from *Macropipus holsatus* 15

I. BRAD, ZOIŢA MARCU, GH. OLTEANU, ELENA MOLDOVEANU, Isoperoxidases differentiations after their activity variation as a function of substrates concentration 19

A. BUSUIOC, C. COTRUŢ, Magnesium influence on inorganic pyrophosphatase activity in rat liver 25

MIOARA CĂRSTEANU, The exosmosis of free aminoacids from vertebrates skin in phylogenesis 31

ELENA HADARAG, The inhibitory effect of lithium salts upon the pyrophosphatase activity 37

IOANA HAGIMA-CĂLIN, Peroxidase in maize during the first developing stages . 47

A. MOTAHARI, A. KECHTKAR, The change of food dyes 55

G. NEAMŢU, C. BODEA, Chemotaxonomic studies on higher plants. III. The carotenoids of *Viscum album* L. 59

ELENA NICOARĂ, CORINA BILAUS, C. BODEA, I. PETRESCU, The Carotenoids from *Carcinus mediterraneus* 65

EUG. PĂUNESCU, I. POPESCU, ANETA ŞERBESCU, Preparation of a ^{131}I-labelled tuberculoproteine with high immunogenic specificity 69

M. PECEC, Experimental method for the determination of K_0 in experiments employing "insolubilized" antigens (immunoadsorbents, cells) 75

M. ŞERBAN, ELENA PRAHOVEANU, Lactate dehydrogenase isoenzymes and activity in serum of rabbits inoculated with dermovaccinia 79

REVIEW

M. V. IONESCU, Antibiotics from higher plants 85

BOOK REVIEW 103

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 1, p. 1—108, Bucureşti, martie, 1970

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 5–8, (1970)

INFLUENȚA GRUPĂRILOR TIOLICE ASUPRA VITEZEI DE GERMINARE ȘI ASUPRA PROCESELOR METABOLICE DIN SEMINȚELE DE LEGUME NORMAL ȘI GREU GERMINABILE

S. OERIU și B. MĂNESCU

Rezumat. — Semințele de legume normal și greu germinabile, tratate cu folcisteina Oeriu „P", prezintă o intensificare a proceselor metabolice.

Potențialul biologic al plantelor cultivate stă sub influența a numeroși factori; printre aceștia, un rol important îl deține facultatea germinativă a semințelor, care contribuie esențial la răsărirea uniformă a semănăturilor și la realizarea unei recolte corespunzătoare.

Cum în timp facultatea de germinare a semințelor scade, s-au preconizat variate metode fizico-chimice și chimice de inhibare a acestui proces. Unele din metodele fizico-chimice folosite la stimularea vitezei de germinare, încolțirea semințelor, creșterea vegetativă și fructificare s-au dovedit a fi utile [1], [4], [6], [10]. Sînt de asemenea cunoscute numeroase studii privind acțiunea unor substanțe organice, sintetice și naturale, care tind la ameliorări în sensul arătat.

Pornind de la ipoteza că intensificarea proceselor metabolice va influența viteza de germinare și cunoscînd acțiunea de potențare a metabolismului general de către folcisteina Oeriu „P" (FOP) [7], [8], [9], ne-am propus studiul acțiunii ei asupra vitezei de germinare la unele semințe de legume.

MATERIALUL FOLOSIT ȘI METODA DE LUCRU

Experiențele s-au efectuat la Institutul de cercetări pentru legumicultură și floricultură în perioada 1965—1967. Ca material de lucru s-au folosit semințe normal germinabile din specii și soiuri diferite: tomate, soiul Seelandia; ardei gras, soiul București; castraveți, soiul Sporu; vinete, soiul Delicia, precum și semințe greu germinabile de ardei gras, soiul București.

În prima etapă s-a urmărit stabilirea concentrației și a duratei optime de contact a semințelor menționate cu folcisteină înainte de a fi trecute în cutii Petri, pe substrat din nisip umectat cu apă. Concentrațiile au fost de $1/10^7$, $1/5.10^6$, $1/5.10^5$, $1/10^5$, iar timpul de contact cu FOP, respectiv apă (pentru martor), a fost de 4, 2, 1 și 1/2 h.

În etapele următoare s-a studiat viteza de germinare la semințele cu germinație normală și la cele greu germinabile, în condițiile umectării cu folcisteină, respectiv cu apă (martor), a hîrtiei de filtru de pe cutiile Petri cu nisip, metodă care s-a dovedit indicată. La variantele tratate cu folcisteină s-au folosit concentrațiile de 1/40 000 și 1/100 000 ml. Germinarea a avut loc în termostat la temperatura constantă de 25°C. Concentrația inițială a soluției s-a păstrat prin adăugare, la 24 de ore, a unei cantități de apă corespunzătoare părții evaporate.

Pentru stabilirea eventualelor diferențieri cantitative ale unor aminoacizi și glucide din semințele normal și greu germinabile, martore și tratate cu FOP, s-au făcut determinări de aminoacizi [3], [5] și glucide [2].

REZULTATE

Viteza optimă de germinare s-a obținut la contactul de 2 și 4 h cu FOP $1/10^5$.

Cea mai accentuată diferențiere a vitezei de germinare la semințele tratate față de martori se observă în condițiile tratării indicate în tabela 1 la semințele de castraveți; în ordine descrescîndă urmează diferențierile la semințele de tomate, vinete (tabela 1), ardei gras (tabela 2).

Tabela 1

Coeficienții vitezei de germinație a semințelor păstrate pe hîrtie de filtru, umectată cu folcisteină, respectiv apă

Semințele experimentale	Martor (apă)	FOP	
		(1/40 000)	(1/100000)
Castraveți, soiul Sporu	63,64	91,59	73,33
Tomate, soiul Seelandia	49,75	52,94	56,93
Vinete, soiul Delicia	49,74	52,11	53,59

Tabela 2

Media valorilor (în substanță uscată) a unor aminoacizi și glucide din semințele normal și greu germinabile de ardei gras, soiul București

Varianta	Aminoacizi (mg%)					Glucide (g%)		
	glutamină	acid aspartic	acid glutamic	valină	leucină	zaharoză	glucoză	fructoză
	Semințe normal germinabile							
Martor (apă)	250	40	62,5	150	82,5	3,5	2,8	0,35
FOP 1/40 000	250	52,5*	82,5*	140	98	3,5	3,0	0,4
FOP 1/100 000	245	35	70,6	160	76	3,0	2,0	0,2
	Semințe greu germinabile							
Martor (apă)	95	40	60	60	57,5	1,85	0,9	0,1
FOP 1/40 000	145*	60*	65	65	60	3,50*	1,2	0,25*
FOP 1/100 000	120*	62,5*	80*	75*	57,5	3,50*	1,5*	0,4*

* = $P < 0,01$.

La semințele de ardei gras cu germinație inițială slabă, acțiunea folcisteinei (FOP-V_2 și FOP-V_3) se manifestă, față de varianta martor tratată cu apă (V_0), printr-o creștere a vitezei de germinare pe toată durata experienței. Determinările biochimice indică o stimulare semnificativă ($P < 0,01$) a sintezei unor aminoacizi la semințele normal germinabile (acid aspartic, acid glutamic — V_2) și la semințele greu germinabile (glutamină și acid aspartic — V_2; glutamină, acid glutamic, acid aspartic, valină-V_3); la aceste semințe se observă la V_1 o stimulare semnificativă ($P < 0,01$) a sintezei zaharozei și fructozei și la V_3 a zaharozei, glucozei și fructozei (tabela 2).

DISCUȚII

Grupările SH potențează sinteza proteică și viteza de germinare a semințelor normal germinabile. La această observație se adaugă și aceea privind sinteza proteică scăzută a semințelor greu germinabile față de cele normal germinabile și potențarea acesteia la semințele tratate. Reducerea facultății germinative, însoțită de micșorarea sintezei proteice, reprezintă un fenomen de îmbătrînire precoce, propriu tuturor organismelor vii [7], [8], iar potențarea sintezei proteice a semințelor greu germinabile de către grupările SH puse în libertate enzimatic în organism de folcisteină confirmă rolul grupărilor SH în stimularea proceselor metabolice ale acestora [9].

CONCLUZII

Datele preliminare duc la următoarele concluzii:

1). Folcisteina Oeriu „P", prin grupările ei tiolice eliberate enzimatic în organism, stimulează semnificativ viteza de germinare a semințelor de castraveți și tomate.

2). Semințele de ardei gras cu facultatea germinativă slabă prezintă și o sinteză proteică scăzută. Sub acțiunea folcisteinei, în concentrație de 1/40 000 și 1/100 000 ml, sînt potențate semnificativ germinația și sinteza proteică.

Prezentată la redacție la 16 septembrie 1969

Institutul de cercetări pentru legumicultură și floricultură
și
Colectivul de chimioterapie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. Bunescu D., *Recomandări pentru producții*, ICAR, 1966, p. 12.
2. Davidescu D., Ionescu M., Mănescu Magda, Pavlovschi Gh., Slușanschi H., *Metode de analize chimice și fizice folosite în agricultură*, Edit. Academiei, București, 1963, p. 102—119.
3. Hais J. M., Macek K., *Paper Chromatography*, Edit. tehnică, București, 1960, p. 525.
4. Heydecker W., Nature, **210**, 753—754 (1966).

5. LEDERER E., *Chromatographie en Chemie Organique*, Masson, Paris, vol. II, 1962, p. 156.
6. MĂNESCU B., BĂLAN D., BĂLAN E., Analele româno-sovietice, seria Agricultură-zootehnie, *5*, 23 (1960).
7. OERIU S., *Proteins in Development and Senescence*, sub. red. B. L. STREHLER, Acad. Press, New York, vol. 1, 1964, p. 23—85.
8. OERIU S., *VI—th Intern. Congress of Biochemistry*, aug. 1964, New York, Abstracts, p. 42.
9. OERIU S., OERIU I., *V—th Intern. Congress of Chemotherapie, Vienna, Jun. 26 — July 3, 1967*, Proceedings, p. 155—163.
10. SUIN K. A., J. Sodi Ogorod, *2*, 44 (1955).

THE INFLUENCE OF THIOLIC GROUPS ON THE GERMINATION RATE AND ON THE METABOLIC PROCESSES OF NORMAL AND HARDLY GERMINATED LEGUMINOUS SEEDS

SUMMARY

Normal and hardly germinated leguminous seeds treated with Folcysteine Oeriu "P" show an increase of the metabolic processes.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 9–14, (1970)

ACȚIUNEA UNOR REACTIVI CHIMICI ASUPRA PROTEINELOR CELULARE ÎN PROCESUL FIXĂRII

II. DATE CANTITATIVE CU PRIVIRE LA ACȚIUNEA FIXATORILOR CARNOY, FORMOL ȘI ALCOOL-FORMOL ASUPRA AMINOACIZILOR LIBERI ȘI HIDROLIZATULUI PROTEIC

H. ARAȚEI și ALICE KAPRI

Rezumat. — S-a folosit ficat de șobolan, fixat și nefixat. Fixarea s-a făcut în lichidul Carnoy, formol neutru 8%, alcool-formol (2 : 1), timp de 3 ore pentru primul și ultimul fixator și timp de 24 de ore pentru formol. Fixarea s-a făcut la rece (4°C). Analiza cromatogramelor efectuate pe omogenate de ficat a arătat că lichidul Carnoy păstrează cel mai bine aminoacizii în comparație cu ceilalți doi fixatori.

Presupunem că identificarea histochimică a unui aminoacid se datorează atît prezenței lui în stare liberă, cît și legat proteic.

Într-o notă anterioară am încercat să arătăm care este efectul fixatorilor histochimici, ca, de exemplu, alcoolul, acetona și acidul monoiodacetic, asupra aminoacizilor liberi (AAL) și hidrolizatului proteic (AAH) [1]. În prezenta notă dorim să analizăm cum influențează alți fixatori (Carnoy, formol și alcool-formol) AAL și AAH, mai cu seamă că acești fixatori sînt recomandați de histochimiști în metodele lor de evidențiere pe cale histochimică a aminoacizilor prezenți în țesuturi [2], [4], [5], [6], [7], [8].

MATERIAL ȘI METODĂ

Am folosit ficat de șobolan alb în greutate de 125—150 g (am utilizat 10 șobolani). Din fiecare ficat s-au făcut cîte patru probe, în felul următor : 1 g ficat s-a fixat în Carnoy (alcool absolut : cloroform : acid acetic glacial 6 :3 :1), 1 g s-a fixat în formol neutru 8%, 1 g s-a fixat în alcool-formol (alcool 96% : formol 35%, 2 :1) și 1 g s-a folosit nefixat.

Înainte de fixare, probele erau tăiate în felii de 1—3 mm. Fixarea s-a efectuat la temperatura de +4°C, timp de 3 ore pentru amestecul Carnoy și alcool-formol și timp de 24 de ore pentru fixarea în formol, deoarece fragmentul de țesut nu se fixează în formol numai în decurs de 3 ore. Țesutul nefixat s-a prelucrat după 3 ore de la recoltare (în acest interval de timp țesutul s-a păstrat în ser fiziologic la 4°C.

După fixare, țesutul a fost omogenizat la rece și apoi centrifugar timp de 20 min la 1900 g și +4°C, în centrifuga cu răcire Janetzki K 23.

Supernatantul s-a cules într-o eprubetă în care s-a făcut delipidarea cu cloroform. După separare, stratul apos s-a diluat cu apă distilată pînă la un volum final de 25 ml, apoi s-a trecut printr-o coloană cu Dowex 50, forma H^+, 200/400 mesh. În continuare, pentru desalifierea probelor și eluarea aminoacizilor de pe coloană s-a folosit tehnica Mueller și colab. [7].

Eluatele ce conțin aminoacizi s-au evaporat la sec, pe baia de apă, la 60°C.

Pentru obținerea AAH se face hidroliză cu acid clorhidric 6N, în proporție de 1 :3, și se menține pe baia de apă, la 100°C, într-un balon cu refrigerent ascendent, timp de 12 ore. Hidrolizatul se filtrează, se neutralizează și se desalifiază prin tehnica folosită și în cazul AAL.

Pentru cromatografie s-a folosit sistemul bidimensional. Probele s-au aplicat pe hîrtie S. S. 2043 a, în spoturi de 80 µl pentru AAL și de 10 µl pentru AAH.

Developarea s-a făcut în sistemele : alcool butilic normal, acid acetic, apă (4 :1:5) și fenol saturat cu apă. În primul sistem, irigarea s-a repetat de două ori în aceeași direcție, apoi o dată în sens perpendicular în sistemul al doilea. După fiecare irigare, cromatogramele s-au uscat la temperatura camerei. După ultima uscare, pentru a îndepărta urmele de solvenți, cromatogramele s-au ținut cîteva minute în etuvă la 60°C, apoi s-au pulverizat cu o soluție butanolică de ninhidrină 0,2%. Citirea probelor s-a făcut la spectrofotometrul Jouan, pe lungimea de undă de 530 mµ. Exprimarea cantitativă s-a făcut după o probă etalon, ca în nota precedentă [1].

REZULTATE

Tabelele 1 și 2 cuprind rezultatele determinărilor cantitative, exprimate în mg/g țesut umed. Pe cromatogramele prelucrate în vederea determinărilor AAL s-au pus în evidență : alanina, histidina, cistina, ciste-

Tabela 1

Cantitatea de aminoacizi liberi (AAL), mg/g țesut umed (valori medii și deviația medie standard) pe un număr de 10 probe

Nr. crt.	Denumirea aminoacidului	Fixatorul întrebuințat			Nefixat
		Carnoy	formol	alcool-formol	
1	Alanină	2,14±0,18	1,54±0,33	1,22±0,42	2,76±0,24
2	Histidină	0,64±0,15	1,28±0,13	1,28±0,15	2,14±0,40
3	Cisteină	2,80±0,68	0,00	0,00	2,80±0,68
4	Cistină	2,46±0,32	1,03±0,33	1,43±0,40	1,64±0,41
5	Ac. aspartic	1,48±0,54	1,93±0,63	1,48±0,27	1,48±0,25
6	Ac. glutamic	0,98±0,29	0,65±0,10	0,98±0,24	0,98±0,29
7	Serină	1,30±0,26	0,77±0,15	0,77±0,15	1,30±0,23
8	Glicocol	0,64±0,13	0,51±0,06	0,51±0,06	0,63±0,10
	Total	12,44	7,79	7,67	13,74

ina, acidul aspartic, acidul glutamic, serina, glicina (tabela 1). Pe cromatogramele prelucrate în vederea determinărilor AAH s-au pus în evidenţă fenilalanina, leucina şi triptofanul (în bloc), valina şi metionina (în bloc), alanina, histidina, cistina, cisteina, acidul aspartic, acidul glutamic, serina, glicina, arginina, tirozina, treoninalizina şi prolina. Ultimii trei aminoacizi nu au putut fi determinaţi cantitativ din lipsa aminoacizilor etalon de comparaţie (tabela 2).

În tabela 3 redăm raportul cantitativ dintre aminoacizii găsiţi după fixare şi aminoacizii din ţesutul nefixat.

Tabela 2

Cantitatea de aminoacizi din hidrolizat (AAH), mg/g ţesut umed (valori medii şi deviaţia medie standard) pe un număr de 10 probe

Nr. crt.	Denumirea aminoacidului	Fixatorul întrebuinţat			Nefixat
		Carnoy	formol	alcool-formol	
1	Fenilalanină-leucină-triptofan	0,61±0,20	0,54±0,27	0,88±0,10	0,61±0,13
2	Valină-metionină	0,22±0,005	0,80±0,30	0,00	0,24±0,05
3	Alanină	0,60±0,20	0,60±0,12	0,92±0,52	7,38±0,13
4	Histidină	0,64±0,10	0,64±0,43	0,00	1,28±0,17
5	Cisteină	3,28±0,82	0,00	0,00	3,28±0,82
6	Cistină	1,23±0,27	0,82±0,20	2,05±0,65	2,05±0,41
7	Ac. aspartic	1,48±0,29	1,48±0,28	0,98±0,08	7,86±0,98
8	Ac. glutamic	1,64±0,32	1,64±0,39	0,66±0,19	6,80±0,17
9	Serină	0,77±0,01	0,77±0,12	0,77±0,12	4,40±0,59
10	Glicocol	0,26±0,06	0,52±0,05	0,44±0,10	2,07±0,18
11	Arginină	0,00	0,66±0,42	0,00	0,80±0,20
12	Tirozină	0,00	0,00	0,00	1,34±0,37
13	Treonină	?	?	?	?
14	Lizină	?	?	?	?
15	Prolină	?	?	?	?
	Total	10,73	8,47	6,70	38,11

Tabela 3

Valoarea raportului cantitativ dintre aminoacizii din ţesutul fixat şi cel nefixat

Nr. crt.	Denumirea aminoacidului	Aminoacizi liberi (AAL)			Aminoacizi din hidrolizat (AAH)		
		Carnoy	formol	alcool-formol	Carnoy	formol	alcool-formol
1	Fenilalanină -leucină-triptofan	0,00	0,00	0,00	1,00	0,88	0,14
2	Valină-metionină	0,00	0,00	0,00	0,92	3,34	0,00
3	Alanină	0,77	0,55	0,44	0,08	0,08	0,12
4	Histidină	0,29	0,59	0,59	0,50	0,50	0,00
5	Cisteină	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
6	Cistină	1,50	0,62	0,86	0,96	0,40	1,00
7	Ac. aspartic	1,00	1,31	1,00	0,18	0,18	0,12
8	Ac. glutamic	1,00	0,66	1,00	0,24	0,24	0,09
9	Serină	1,00	0,59	0,59	0,17	0,17	0,17
10	Glicocol	1,00	0,80	0,80	0,12	0,25	0,21
11	Arginină	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	0,00

Aminoacizii liberi (AAL)

Printre aminoacizii cei mai bine „fixați" în țesutul hepatic se află cisteina (în Carnoy); ea depășește valoarea găsită în țesutul nefixat (tabelele 1 și 3). După cisteină urmează cistina, acidul aspartic, acidul glutamic, serina și glicina. Dintre aceștia, acidul aspartic este mai bine „fixat" în formol. Acizii cei mai slab „fixați" sînt histidina (în Carnoy), alanina, histidina și cisteina (în formol), histidina, serina și alanina (în alcool-formol). Se observă că histidina este cel mai slab „fixată", indiferent de fixatorul întrebuințat.

Aminoacizii rezultați prin hidroliză (AAH)

Țesutul nefixat prezintă cantitatea cea mai mare de aminoacizi, cu excepția cisteinei, care într-un singur caz a dat valori egale cu cele din țesutul fixat în Carnoy. În ceea ce privește valina-metionina, acestea sînt mai bine păstrate în formol, iar cantitatea găsită depășește de 3,34 ori cantitatea din țesutul nefixat (tabela 3). Fixarea în alcool-formol pare să nu fie cea mai potrivită, cu excepția cazului cisteinei, la care raportul dintre țesutul fixat și cel nefixat este egal cu unitatea (tabela 3). În genere, se poate observa că în Carnoy se păstrează cel mai bine fenilalanina-leucina-triptofanul (care apar pe cromatogramă ca un singur spot), valina-metionina, cisteina și cistina, iar în formol se păstrează tot fenilalanina-leucina-triptofanul, valina-metionina și arginina.

DISCUȚII

Rolul fixatorilor este de a păstra cît mai bine structura inițială a țesutului, precum și compoziția sa chimică. Fixatori ideali nu se găsesc și, în general, o fixare bună poate menține în topografia tisulară inițială, existentă înainte de fixare o serie de macromolecule, cum sînt: proteinele, carbohidrații, acizii nucleici. În ceea ce privește proteina, o cantitate mare de molecule sînt ireversibil schimbate [5]. Lillie [6] ajunge la concluzia că lichidul Carnoy este superior formolului în privința păstrării grupelor sulfhidrilice. Datele noastre confirmă acest lucru, deoarece cisteina, atît din AAL cît și din AAH, se păstrează mai bine în Carnoy decît în formol sau în amestecul alcool-formol (tabelele 1, 2 și 3). Din analiza rezultatelor noastre se pare că acest fixator păstrează mai bine aminoacizii liberi decît pe cei rezultați din hidroliză (tabelele 1 și 2). Părerea noastră este că acest fixator, acționînd timp de 3 ore, permite ca o parte din enzimele proteolitice să-și exercite acțiunea pînă la terminarea fixării; în felul acesta găsim în țesutul fixat o cantitate mai mare de AAL, cum este, de exemplu, cisteina (tabela 3).

Faptul că timpul de fixare influențează asupra cantității de aminoacizi pe care o găsim cromatografic explică diferențe între cantitatea totală de aminoacizi identificați în nota precedentă [1] și cea din nota prezentă. Mai mult, scăderea concentrației în AAH face să crească concentrația în AAL. Astfel, pe cînd în prima notă [1] concentrația de AAH era de 58,47 mg/g și cea de AAL de 4,37 mg/g, acum se constată că AAH ating cifra medie de 38,11 mg/g, iar în schimb AAL ating valoarea de 13,74 mg/g.

În ceea ce privește formolul, datele biochimice din literatură arată, că el se poate combina cu o serie întreagă de grupe reactive (amino, imino, guanidinice, carboxilice și sulfhidrilice) [8], [9]. Barka [2] arată că formolul este aproximativ tot atît de bun pentru „fixarea" aminoacizilor ca și alcoolul. Într-adevăr, dacă se cercetează acțiunea alcoolului demonstrată de noi [1], atunci se pot observa rezultate similare pentru alanină, histidină, cisteină și serină (AAL), iar în privința AAH această observație se poate constata numai la arginină și cisteină. În condițiile noastre de lucru, se pare că alcoolul este superior formolului.

Utilizarea formolului se datorește și faptului că el poate fi folosit ca agent de polimerizare [3], [8]. French și Edsall (citați de [8]) sînt de părere că cea mai frecventă reacție a formolului ar fi adiția la un compus ce conține un hidrogen activ RH, cu formarea unui compus hidroximetilic de tipul $R-CH_2$ (OH). De obicei, produsul este reactiv și se poate condensa cu un alt hidrogen, pentru a forma o punte metilenică ($-CH_2-$), care este ușor ruptă prin hidroliză. Este aproape limpede că, utilizînd formolul neutru în concentrație de 8% la temperatura de 4°C, există o probabilitate mai mică de a forma compuși de adiție și punți. Este probabil ca hidrogenul aromatic și grupele NH_2 să formeze complecși pe care noi îi putem păstra în procesul fixării.

Acțiunea fixatorului alcool-formol întrebuințat de noi nu este descrisă în literatura avută la dispoziție. Din analiza rezultatelor noastre se poate constata că efectul amestecului alcool-formol este similar cu al formolului (tabela 3), și aceasta numai în privința AAL. Cît privește AAH, acțiunea amestecului este mai slabă, cu excepția cisteinei. Este adevărat că în formol țesutul este păstrat 24 de ore, în timp ce în alcool-formol numai 3 ore. Aceasta ne face să presupunem că alcoolul nu antrenează destul de repede formolul din amestec, pentru a avea o acțiune fixatoare optimă în curs de numai 3 ore. Cu toate acestea, înclinăm să credem că unele proprietăți ale formolului se păstrează în amestec pentru AAL, cum sînt : histidina, serina, glicina, și cu mici diferențe pentru alanină și cisteină. Pentru AAH, valorile sînt apropiate numai la doi aminoacizi : serina și glicina.

În ceea ce privește celălalt component, alcoolul, acesta ar acționa similar în amestec ca și în stare liberă, dar numai pentru anumiți aminoacizi (tabela 3). Cu toate aceste similitudini, amestecul alcool-formol rămîne inferior formolului și alcoolului luați separat.

CONCLUZII

Comparînd cei trei fixatori întrebuințați de noi, se poate constata că lichidul Carnoy păstrează cea mai mare cantitate de AAL și AAH, după care urmează formolul. Aminoacizii pe care îi punem în evidență pe cale histochimică ar putea fi prezenți în stare liberă, dar și legați proteic.

Prezentată la redacție la 20 martie 1969

Secția de histochimie,
Institutul de cercetări medicale
Iași

BIBLIOGRAFIE

1. ARAȚEI H., KAPRI ALICE, St. cerc. biochim., **11**, 363 (1968).
2. BARKA T., ANDERSEN P. J., *Histochemistry, theory, practice and Bibliography*, Harper and Row, Publ. Inc., New York — Londra, 1965, p. 37.
3. BHATTACHARYA R., SEN P. B., Acta histochem., **28**, 86 (1967).
4. BURSTONE M. S., *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*, Acad, Press, New York — Londra, 1962, p. 54.
5. DANIELLI J. E., *Cytochemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1953, cap. I.
6. LILLIE R. D., *Histopathologic technic*, The Blakiston Company, Philadelphia — Toronto, 1948, p. 42.
7. MUELLER G. C., BOWMAN G., AILEN H., Anal. chem., **27**, 1357 (1955).
8. PEARSE E., *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Churchill, Londra, 1961, cap. I și II.
9. THOMAS W. S., *Selected Histochemical and Histopathological Methods*, Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illionis, 1966, p. 157.

THE ACTION OF SOME CHEMICAL REAGENTS ON CELL PROTEINS IN THE FIXATION PROCESS. II

SUMMARY

We utilized in this experiment fixed and unfixed rat liver. The fixations were made in Carnoy fluid, in 8% formaldehyde and ethanol-formaldehyde (2 :1), three hours for Carnoy and ethanol-formaldehyde and 24 hours for formaldehyde. Fixations were made at +4°.

The chromatographic analysis shows that Carnoy's fluid preserves aminoacids better than formaldehyde and ethanol-formaldehyde in both AAL and AAH.

We suppose that the histochemical identification of an aminoacid is due to its presence in both free (AAL) and protein-bound (AAH) state.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 15–18, (1970)

STUDIUL COMPARATIV, PE ORGANE ŞI SEXE, AL CAROTINOIDELOR DIN *MACROPIPUS HOLSATUS*

CORINA BILAUS, ELENA NICOARĂ, C. BODEA* şi I. PETRESCU**

Rezumat. — S-au cercetat pigmenţii carotinoidici din crustaceul decapod *Macropipus holsatus*, pe organe şi pe sexe. Atît cantitatea totală de pigmenţi carotinoidici, cît şi raportul dintre diferitele carotinoide diferă la cele două sexe. Hepatopancreasul, ochii şi resturile corporale sînt mai pigmentate la femele, pe cînd pereiopodele la indivizii masculi. Diferenţe calitative mai evidente, dependente de sex, se constată la nivelul hepatopancreasului şi în cleşti.

În continuarea cercetărilor noastre asupra carotinoidelor din crustacei [1], [2], am luat în studiu decapodul *Macropipus holsatus* sau crabul de nisip, unul din crabii cei mai răspîndiţi în Marea Neagră.

Am considerat interesant să determinăm conţinutul în carotinoide, diferenţiat nu numai pe organe, ci şi pe sexe. Informaţii în acest sens nu am găsit în literatură, în afara unor date referitoare la conţinutul în carotinoide din doi crustacei amfipozi [3], la care s-au găsit diferenţe mari între antenele indivizilor masculi, puternic pigmentate, şi cele ale femelelor, aproape lipsite de pigmenţi; această diferenţă a fost corelată cu capacitatea indivizilor masculi de a detecta femelele mature.

MATERIAL ŞI METODE

Materialul biologic a fost recoltat viu la talian şi a constat în 68 de indivizi masculi şi 47 de femele. Acest material a fost disecat în următoarele părţi: hepatopancreas, pedunculi oculari, pereiopod I (13), pereiopode II—V şi resturi corporale, şi apoi conservat în metanol.

Extracţia, separarea şi identificarea pigmenţilor s-au făcut, în principiu, după metoda întrebuinţată de noi în lucrarea anterioară [2], la care s-au adus unele modificări pentru a putea prelucra concomitent toate extractele. Acest lucru era necesar pentru a sesiza diferenţele existente între sexe în ceea ce priveşte conţinutul în carotinoide al diferitelor organe.

Pigmenţii din extractele metanolice şi acetonice au fost deplasaţi în eter etilic, iar după măsurarea volumului total o cotă parte a fost evaporată la sec. Pigmenţii au fost reluaţi în metanol şi apoi s-a determinat

* Pentru partea chimică.
** Pentru partea biologică.

extincţia între 400 şi 490 mμ, domeniu care cuprinde maximele tuturor pigmenţilor carotinoidici urmăriţi.

Determinarea conţinutului total în pigmenţi s-a făcut luînd în calcul $E^{1\%}_{1cm}$ corespunzător pigmenţilor principali identificaţi ulterior.

Conţinutul total în pigmenţi, diferenţiat pe organe şi sexe, este redat în tabela 1.

Tabela 1

Conţinutul total în carotinoide al diferitelor organe de *Macropipus holsatus* (mg/100 g substanţă uscată)

Organul	♂♂	♀♀
Hepatopancreas	4,08	7,34
Pedunculi oculari	4,72	11,33
Pereiopod I	1,17	1,10
Pereiopode II—V	0,98	0,75
Resturi corporale	0,13	0,32

Separarea carotinoidelor s-a făcut pe plăci de MgO, irigate cu amestec de neofalină : acetonă 5 :1, cu excepţia pigmenţilor din hepatopancreas, pentru separarea cărora s-au făcut două cromatografieri : prima pe silicagel, pentru îndepărtarea grăsimilor şi separarea pigmenţilor mobili, iar a doua pe MgO.

Pentru a sesiza diferenţele calitative şi cantitative dintre pigmenţi, atît pe organe, cît şi pe sexe, s-au executat cromatograme cu spot sub formă de picături, aplicînd pe aceeaşi placă cîte o picătură din extractele

Tabela 2

Raportul dintre diferitele carotinoide, exprimat în fracţiuni din întreg

Organul şi sexul		Pigmentul				
		β-carotină	cantaxantină	astaxantină	luteină şi zeaxantină	xantofile neidentificate
Hepatopancreas	♂♂	0,08	0,10	0,50	0,12	0,20
	♀♀	0,20	0,10	0,50	urme	0,40
Pedunculi oculari	♂♂	0,15	—	0,85	urme	—
	♀♀	0,15	—	0,85	urme	—
Pereiopod I (cleşte)	♂♂	0,10	—	0,55	0,30	0,05
	♀♀	0,10	—	0,55	0,30	0,05
Pereiopode II—V	♂♂	0,10	—	0,65	0,20	0,05
	♀♀	0,10	—	0,55	0,30	0,05
Resturi corporale	♂♂	0,10	—	0,65	0,20	0,05
	♀♀	0,10	—	0,55	0,30	0,05

aparţinînd aceluiaşi organ, dar provenind de la sexe diferite, alături de o picătură din amestecul celor două extracte. Pe de altă parte, pentru a sesiza diferenţele dintre pigmenţii din pereiopodul I (cleşte), pereiopodele II-V şi resturile corporale s-au executat, pe aceeaşi placă, cromatograme paralele cu extracte provenind de la acelaşi sex.

Raportul dintre diferiţii pigmenţi a fost apreciat după mărimea şi intensitatea petelor şi exprimat în fracţiuni din întreg.

Au fost identificate următoarele carotinoide : β-carotina, cantaxantina, astaxantina, luteina şi zeaxantina. Pe lîngă aceşti pigmenţi, pe placa cromatografică s-a sesizat prezenţa unei xantofile foarte puţin mobile, care n-a fost identificată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele prezentate în tabelele 1 şi 2 reiese că există diferenţe între sexe atît în cea ce priveşte cantitatea totală de pigmenţi carotinoidici din organele cercetate, cît şi în ceea ce priveşte raportul dintre diferitele carotinoide.

Hepatopancreasul, pedunculii oculari şi resturile corporale sînt mult mai pigmentate la femele, pe cînd pereiopodele sînt ceva mai pigmentate la indivizii masculi.

β-Carotina este reprezentată la ambele sexe relativ uniform în organele cercetate, cu excepţia hepatopancreasului, unde la femele ea se află în cantitate mult mai mare.

Cantaxantina este inegal repartizată în diferitele organe. Prezenţa ei a putut fi pusă în evidenţă numai în hepatopancreas, iar la indivizii masculi şi în cleşte.

Astaxantina, pigmentul predominant în toate organele cercetate, reprezintă la femele, în comparaţie cu masculii, fracţiuni mai mici din totalul de pigmenţi. Luteina şi zeaxantina, în schimb, sînt reprezentate prin fracţiuni mai mari la femele. Xantofila neidentificată se găseşte în cantităţi mici, cu excepţia hepatopancreasului. În pedunculii oculari se remarcă existenţa xantofilelor numai în urme.

Din modul cum pigmenţii carotinoidici sînt reprezentaţi în organe şi sexe la *Macropipus holsatus* se remarcă diferenţe mai evidente, dependente de sex, la nivelul hepatopancreasului şi în cleşti. Aceste constatări ar putea constitui obiectul unor discuţii, considerăm însă că acestea sînt premature înainte de a avea un material experimental mai bogat, prin cercetarea carotinoidelor şi la alţi crustacei.

Prezentată la redacţie la 10 iulie 1969

Catedra de biochimie
Institutul agronomic
Dr. P. Groza, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, E. Nicoară, Gh. Illyes, M. Şerban, St. cerc. biochim., **8**, *3*, 271 (1965).
2. E. Nicoară, C. Bilaus, C. Bodea, I. Petrescu, St. cerc. biochim. (în acest număr).
3. Michel Barbier, H. Charniaux-Cotton, M. C. Fried-Montaufier, C. R., Acad. Sci. **263**, 1508 (1966).

COMPARATIVE STUDY, BY ORGANS AND SEXES, OF CAROTENOIDS FROM *MACROPIPUS HOLSATUS*

SUMMARY

The carotenoid pigments from the crustacean decapod *Macropipus holsatus* have been studied, differentiatedly by organs and sexes. Both, the whole quantity of carotenoid pigments, and the proportion between individual carotenoids are different in the two sexes. The hepatopancreas, the eyes, and the other body remainders are more pigmented in females, whereas the pereiopods in males. More evident qualitative differences, depending on sex, are established at the level of hepatopancreas and pincers.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 19–24 (1970)

DIFERENȚIERI ALE IZOPEROXIDAZELOR DUPĂ VARIAȚIA ACTIVITĂȚII LOR ÎN FUNCȚIE DE CONCENTRAȚIA SUBSTRATELOR

I. BRAD, ZOIȚA MARCU, GH. OLTEANU și ELENA MOLDOVEANU

Rezumat. — În lucrare sînt prezentate rezultatele obținute la determinarea activității peroxidazei prin variația concentrației peroxidului de oxigen, acidului ascorbic și benzidinei la frunzele și rădăcinile de plantulă de porumb de 7 zile. În paralel s-au analizat și spectrele izoperoxidazice, constatîndu-se diferențieri apreciabile.

Totalitatea constatărilor au dus la concluzia că izoenzimele peroxidazice se diferențiază din punctul de vedere al afinității față de substraturi, fapt care condiționează intensitatea reacției în funcție de concentrație. Capacitatea de afinitate a enzimelor și izoenzimelor condiționează mecanismele de reglare ale proceselor metabolice.

Într-o lucrare anterioară s-a arătat că la plantele care se deosebesc prin rezistența la ger se constată o diferențiere a lor și din punctul de vedere al activității globale catalazice, ca și din punctul de vedere al numărului de fracțiuni izocatalazice și al variației activității catalazice în funcție de gradientul de temperatură (coeficientul van't Hoff) [4].

Prin extrapolare, am ajuns la concluzia că pot exista diferențieri între enzime și din punctul de vedere al variației activității în funcțe de variația concentrației. Ca atare, dacă izoenzimele se pot diferența și prin coeficientul van't Hoff, există probabilitatea ca ele să se diferențieze și printr-un coeficient de concentrație. Pentru aceasta, am considerat că este necesar și suficient să se constate un spectru diferit al izoenzimelor peroxidazice și o variație diferită a activității peroxidazei în funcție de concentrația diferiților reactivi. Analizele executate de noi, prezentate mai jos, au confirmat presupunerea enunțată, fiind astfel scoase în evidență unele mecanisme fine de reglare a proceselor metabolice, legate de particularitățile izoenzimelor. În competiția pentru un substrat, mai ales în condiții în care acesta se găsește în concentrații mici, direcția de transformare va fi condiționată catalitic în funcție de capacitatea afinitară a sistemului enzimă-substrat. Competiția însă se desfășoară nu numai la nivelul enzimelor, ci și la acela al izoenzimelor.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au folosit extracte brute din frunze şi rădăcini de plantule de porumb după 7 zile de la germinare.

Pe acelaşi material s-a determinat activitatea globală a peroxidazei prin metoda cronometrică [3] şi a izoperoxidazelor prin metoda electroforetică pe gel de agar [2].

Determinarea activităţii globale a peroxidazei din frunze s-a făcut pe extract 1 :20, în tampon acetic, pH 4,7, iar a izoperoxidazelor pe extract 1 :2, în tampon barbital, pH 8,6.

Deoarece din determinări prealabile a reieşit că la un raport de extracţie de 1 : 20 activitatea peroxidazică a extractului de rădăcini este practic de două ori mai mare decît aceea a extractului de frunze (de exemplu 55,5 faţă de 24,1), pentru a ajunge la activităţi enzimatice de acelaşi ordin de mărime s-a adoptat ulterior, pentru cazul rădăcinilor, raportul de extracţie 1 :40 în tampon acetat.

Pornind de la aceste activităţi foarte apropiate, s-au făcut determinări de activitate peroxidazică modificînd concentraţiile apei oxigenate (2, 1 şi 0,5%), acidului ascorbic (2, 1 şi 0,5%) şi benzidinei nediluate (0,092 şi 0,046%). Concentraţiile au fost alese după reactivul cu benzidină al lui Bojarkin [1]. Pentru a nu modifica volumul de reacţie, în toate determinările s-au folosit aceleaşi cantităţi de reactivi [3].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinarea electroforetică a izoperoxidazelor, făcută pe acelaşi material (extract 1 : 2 în tampon barbital, pH 8,6), din rădăcină şi frunză, a scos în evidenţă aceeaşi imagine ca şi la determinarea cronometrică, şi anume că activitatea peroxidazei este mai intensă la rădăcină (fig. 1). Diferenţierea nu se rezumă numai la intensitatea activităţii peroxidazice globale, ci şi la spectrul izoperoxidazic. Astfel, la rădăcină s-au diferenţiat 6 fracţiuni catodice şi 2 anodice, în timp ce la frunză s-au diferenţiat 5 fracţiuni catodice şi 4 anodice, care se diferenţiază şi ca proporţie.

Făcînd determinarea în funcţie de gradientul de concentraţie al apei oxigenate, am constatat că la concentraţia de 0,5% activitatea peroxidazei creşte cu 88,3% în frunză şi cu 44,5% în rădăcină (tabela 1) faţă de concentraţia de 1% [3]. Reamintim că pentru concentraţia de 1% a H_2O_2 s-a făcut diluţia extractului din rădăcină, pentru a-i aduce activitatea la aceeaşi valoare cu a extractului de frunză.

Comparativ, se observă că la această concentraţie activitatea peroxidazei din extractul din frunză este apreciabil mai intensă decît cea din rădăcină (tabela 1).

Mărind concentraţia de apă oxigenată la 2%, am constatat o scădere a activităţii peroxidazice globale cu 43,8% în extractul din rădăcină şi cu 58,1% în extractul din frunză. Făcînd comparaţie între activităţile peroxidazelor din extractele din frunză şi din rădăcină, se constată că în acest caz la această concentraţie activitatea peroxidazei din extractul de frunză este mai scăzută cu 27,4% faţă de activitatea peroxidazei din extractul de rădăcină (tabela 1). Datele experimentale dovedesc fără drept

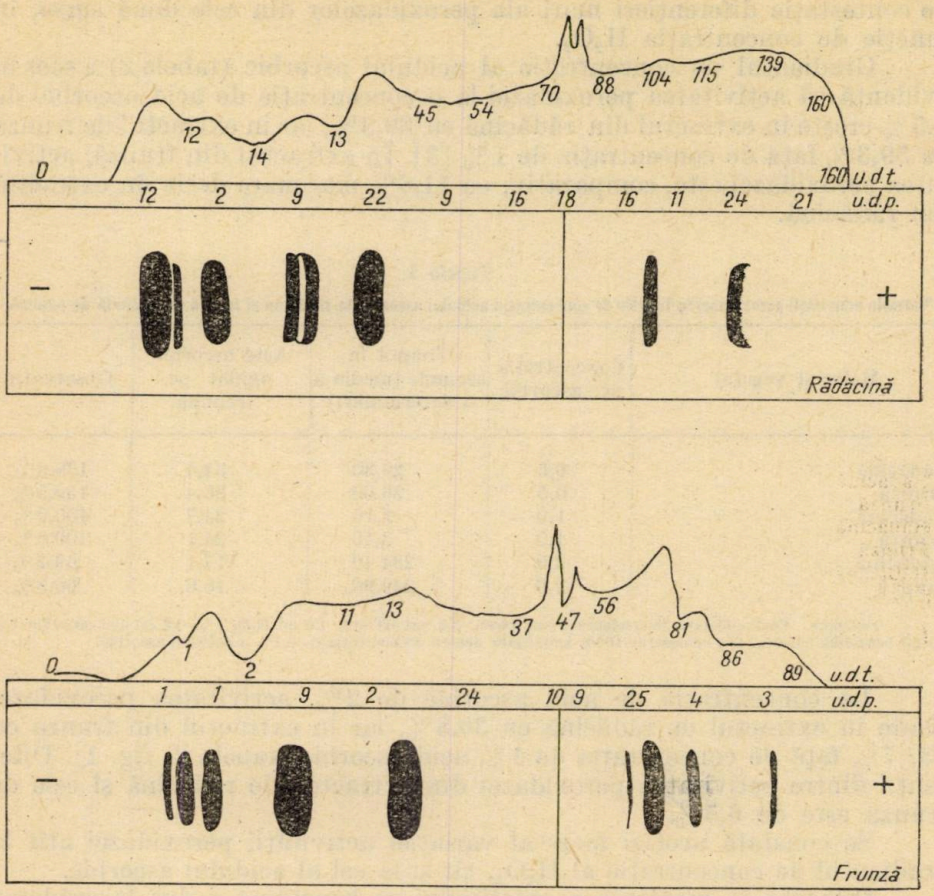


Fig. 1 — Variația spectrului izoperoxidazelor benzidin-peroxid de hidrogen — oxidoreductazei, la rădăcina și frunza de plantulă de porumb, a intensității activității totale și a intensității activității fracțiunilor exprimate în unități densitometrice totale (u.d.t.) și în unități densitometrice parțiale (u.d.p.)

Tabela 1

Variația activității peroxidazei în funcție de concentrația H_2O_2 la rădăcina și frunza de plantulă de porumb

Material vegetal	Concentrația H_2O_2	Timpul în secunde (media a 5 determinări)	Acid ascorbic oxidat pe secundă	Observații
Rădăcină	0,5	55,0	35,7	144,5 %
Frunză	0,5	44,50	45,5	188,3 %
Rădăcină	1,0	1,10	24,7	100,0 %
Frunză	1,0	3,10	24,1	100,0 %
Rădăcină	2,0	143,0	13,9	56,2 %
Frunză	2,0	197,90	10,1	41,9 %

Observație. Pentru fiecare determinare s-au folosit 0,5 ml extract, 1,0 ml H_2O_2. 0,2 ml acid ascorbic 1%, 2,0 ml benzidină 0,092%. S-a considerat 100% activitatea pentru concentrația de 1% a H_2O_2.

de contestație diferențieri mari ale peroxidazelor din cele două surse, în funcție de concentrația H_2O_2.

Gradientul de concentrație al acidului ascorbic (tabela 2) a scos în evidență că activitatea peroxidazei la o concentrație de acid ascorbic de 0,5% crește în extractul din rădăcină cu 39,3%, iar în extractul de frunză cu 59,3% față de concentrația de 1% [3]. În extractul din frunză, activitatea peroxidazei este, comparativ, cu 11,6% mai mare decît în extractul din rădăcină.

Tabela 2

Variația activității peroxidazei în funcție de concentrația acidului ascorbic la rădăcina și frunza de plantulă de porumb

Material vegetal	Concentrația ac. ascorbic	Timpul în secunde (media a 5 determinări)	Acid ascorbic oxidat pe secundă	Observații
Rădăcină	0,5	29,30	34,4	139,3%
Frunză	0,5	26,00	38,4	159,5%
Rădăcină	1,0	1,10	24,7	100,0%
Frunză	1,0	3,10	24,1	100,0%
Rădăcină	2,0	234,40	17,1	69,2%
Frunză	2,0	249,90	16,0	66,3%

Observație. Pentru fiecare determinare s-au folosit 0,5 ml extract, 1,0 ml H_2O_2 1%, 0,2 ml acid ascorbic 1%, 2,0 ml benzidină 0,092%. S-a considerat 100% activitatea pentru concentrația de 0,1% a acidului ascorbic.

La concentrația de acid ascorbic de 2%, activitatea peroxidazei scade în extractul de rădăcină cu 30,8%, iar în extractul din frunză cu 33, 7% față de concentrația de 1% acid ascorbic (tabela 2, fig. 1). Diferența dintre activitatea peroxidazei din extractele de rădăcină și cele de frunză este de 6,5%.

Se constată același mers al variației activității peroxidazei atît la gradientul de concentrație al H_2O_2, cît și la cel al acidului ascorbic.

Diluarea la jumătate a reactivului cu benzidină a dus la scăderea activității peroxidazei atît în rădăcină, cît și în frunză cu 54,2% și, respectiv, 63,5% (tabela 3).

Tabela 3

Variația activității peroxidazei în funcție de concentrația benzidinei la rădăcina și frunza de plantulă de porumb

Material vegetal	Concentrația benzidinei	Timpul în secunde (media a 5 determinări)	Acid ascorbic oxidat pe secundă	Observații
Rădăcină	0,046	177,00	11,3	45, %
Frunză	0,046	225,40	8,8	36,5%
Rădăcină	0,092	1,10	24,7	100,0%
Frunză	0,092	3,10	24,1	100,0%

Observație. Pentru fiecare determinare s-au folosit 0,5 ml extract, 1,0 ml H_2O_2 1%, 0,2 ml acid ascorbci 1%, 2,0 ml benzidină. S-a considerat 100% activitatea pentru concentrația de 0,092% a benzidinei.

Scăderea activității peroxidazei în extractul din frunză este cu 22,2% mai mare decît în extractul din rădăcină.

Totalitatea rezultatelor obținute ne fac să credem că la plantele mai bine adaptate și mai rezistente față de diverși factori enzimele prezintă această caraateristică și predomină fracțiunile cu afinitate mare pentru substrat. Aceasta permite desfășurarea neîntreruptă a procesului catalitic chiar în condițiile în care sinteza substraturilor se desfășoară anevoios. În același timp, dacă există o competiție între mai multe enzime pentru un același substrat, atunci la concentrații scăzute substratul va fi transformat de acea enzimă care are o fracțiune capabilă de a cataliza reacția corespunzător acestei concentrații scăzute. Va fi posibilă astfel desfășurarea procesului catabolic pe calea metabolică, condiționată și de această caracteristică a enzimei.

CONCLUZII

Peroxidaza din frunză se diferențiază de cea din rădăcină nu numai după activitatea globală, ci și după numărul fracțiunilor izoperoxidazice totale, anodice sau catodice.

Prin modificarea concentrației diferitelor substanțe (peroxidul de hidrogen, benzidina și acidul ascorbic) care participă la reacția enzimatică, se constată modificări procentuale diferite ale activității peroxidazei a frunzei, în comparație cu cea din rădăcină, față de o activitate inițială egală, considerată martor.

Diferențierea activității peroxidazei în funcție de concentrația diferiților reactivi, asociată cu diferențierea spectrului izoenzimatic, conduce la concluzia că izoperoxidazele se diferențiază prin afinitatea față de substrat, deci și prin activități diferite în funcție de concentrația substratului, o fracțiune poate fi considerată superioară calitativ din acest punct de vedere atunci cînd, la valori mici ale concentrației substratului, își poate manifesta activitatea catalitică.

Probabil că la plantele mai bine adaptate și mai rezistente față de diverși factori enzimele prezintă această caracteristică și predomină fracțiunile cu afinitate mare pentru substrat.

Prezentată la redacție
la 15 mai 1969

Secția de fiziologie Laboratorul de biochimia plantelor I.C.C.P.T. Fundulea

BIBLIOGRAFIE

1. Bojarkin A. N., Biohimiia, **16**, 352–357 (1951).
2. Brad I., Hurduc N., Niculescu St., Marcu Zoița, St. cerc. biochim., **11**, 117–120 (1968).
3. Brad I., Olteanu G., Marcu Zoița, St. cerc. biochim., **12**, (1969).
4. Brad I., Marcu Zoița, Moldoveanu Elena, Niculescu St., St. cerc. biochim., **12**, 129–133 (1969).

ISOPEROXIDASES DIFFERENTIATIONS AFTER THEIR ACTIVITY VARIATION AS A FUNCTION OF SUBSTRATES CONCENTRATION

SUMMARY

Our results concerning the peroxidase activity in leaves and roots of 7-day old maize seedlings, as determined by the variation in hydrogen peroxide, ascorbic acid as well as bensidine are presented. The isoperoxidase pattern analysed parallelly evealed important differences.

The data led to the conclusion that peroxidase isozymes differ by their affinities to the substrates which in turn are responsible for the reaction intensity as a function of concentration. The affinity capacity of enzymes and isozymes must be responsible for the regulation mechanism of the metabolic reactions.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 25–29, (1970)

INFLUENȚA IONULUI DE MAGNEZIU ASUPRA ACTIVITĂȚII PIROFOSFATAZEI ANORGANICE DIN FICATUL DE ȘOBOLAN

A. BUSUIOC și C. COTRUȚ

Rezumat. — S-a urmărit influența magneziului asupra activității pirofosfatazei anorganice din omogenatul și mitocondriile de ficat de șobolan la diferite pH-uri (4,4 ; 5,6 ; 7,8). În omogenat, ionii de magneziu stimulează activitatea pirofosfatazei la pH 5,6. La același pH, pirofosfataza mitocondrială nu este influențată de acești ioni. La pH 4,4, magneziul exogen inhibă activitatea enzimatică în omogenat. La pH 7,8, enzima este totdeauna dependentă de prezența ionilor de magneziu.

Pirofosfataza mitocondrială din ficatul de șoarece, cercetată de Rafter [1], prezintă o activitate optimă la pH 5,3. În contrast cu pirofosfataza din omogenatul de ficat, care, după Norberg (citat de Rafter) [1], prezintă o activitate considerabilă la adăugarea magneziului la pH 5, pirofosfataza mitocondrială nu necesită un adaos de magneziu, pentru activitatea sa fiindu-i suficient magneziul endogen, prezent în mitocondrii.

Rafter [2] arată că există o identitate între enzima mitocondrială, fosforiltransferaza și pirofosfataza anorganică, amîndouă avînd același pH optim de acțiune și fiind inactivitate de aceleași substanțe, ca fluorură, arsenit.

Nordlie [3], [4] arată că pirofosfat glucozo-fosfotransferaza, glucozo-6-fosfataza și pirofosfataza anorganică sînt activități ale uneia și aceleiași enzime. Activitatea de pirofosfat glucozo-6-transferază crește marcat în domeniul de pH 6 — 7,1 sugerînd posibilitatea reglării acestor activități prin schimbări în pH-ul intracelular [5].

Swanson [6] sugerează că, din cauza marii sale sensibilități la schimbările mici în concentrația ionilor de hidrogen și magneziu, pirofosfataza anorganică din ficat poate fi controlată *in vivo* prin variații minore în concentrația acestor ioni.

Pornind de la aceste considerente, am cercetat influența diverselor concentrații ale ionilor de hidrogen și magneziu asupra activității pirofosfatazei anorganice.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a determinat activitatea pirofosfatazei anorganice la diferite pH-uri optime de acțiune, după Rafter [1], pe omogenat de ficat de șobo-

lan în soluție de EDTA $1 \cdot 10^{-3}$M, centrifugat la 600 g timp de 5 min, și pe mitocondrii. Acestea au fost separate în zaharoză 0,25 M. Depunerea nucleilor și a resturilor celulare s-a făcut prin centrifugare timp de 10 min la 600 g. Mitocondriile au fost depuse din supernatant prin centrifugare la 5 000 g timp de 20 min, apoi au fost spălate cu soluție de zaharoză 0,25 M, depuse din nou și, în sfîrșit, suspendate în soluție de zaharoză 0,25 M, pentru a avea pe ml mitocondriile din 0,1 g tesut.

S-a determinat apoi activitatea pirofosfatazei anorganice, cu soluție de pirofosfat de sodiu (Merk) $1 \cdot 10^{-3}$M, tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,2 M, pH 4,4 și 5,6. Defecarea s-a făcut cu acid tricoloracetic 20% și s-a determinat fosforul anorganic la timpul zero și la 15 min după incubare la 36°C. Pentru pH-ul alcalin s-a utilizat tamponul TRIS-maleat 0,2 M, pH 7,8. S-a folosit de asemenea sulfatul de magneziu în concentrație de $4 \cdot 10^{-1}$M.

REZULTATE

Urmărind activitatea pirofosfatazei anorganice din omogenatul de ficat de șobolan, am determinat în mediul acid, în tampon acid acetic-acetat de sodiu, două pH-uri optime de activitae, anume 4,4 și 5,6. În mediu slab bazic, în tampon TRIS, pH 7,8 am determinat o activitate pirofosfatazică numai în prezența magneziului.

Tabela 1 prezintă influența ionului de magneziu asupra activității pirofosfatazei anorganice la pH 4,4, 5,6 și 7,8.

Tabela 1

Variațiile activității pirofosfatazei anorganice din ficatul de șobolan sub influența Mg++ la pH 4,4, 5,6 și 7,8 (valori medii din 10 determinări)

Fără $MgSO_4$		Cu $MgSO_4$ $4 \cdot 10^{-1}$M	
pH	μmoli PP/100 mg/15′ țesut proaspăt	pH	μmoli PP/100 mg/15′ țesut proaspăt
4,4	5,1±0,1	4,4	0
5,6	5,2±0,1	5,6	7,3±0,1
7,8	0	7,8	7,6±0,1

Tabela 2 prezintă variațiile activității pirofosfatazei anorganice în prezența magneziului și a soluției de EDTA 5.10^{-2}M.

Tabela 3 prezintă influența ionului de magneziu asupra pirofosfatazei anorganice din mitocondriile ficatului de șobolan la pH 5,6 și 7,8.

Optimul de temperatură s-a constatat a fi la 36°C, iar timpul optim de acțiune al pirofosfatazei 15 min, după care activitatea enzimatică scade.

Diferite substanţe, ca sulfatul de zinc $2 \cdot 10^{-1}$ M, cianura de potasiu $2 \cdot 10^{-3}$M, clorura de mangan $2 \cdot 10^{-1}$M, 2,4-dinitrofenolul $5 \cdot 10^{-5}$M, au fost fără efect asupra activităţii pirofosfatazei anorganice atît la pH 4,4, cît şi la pH 5,6.

Tabela 2

Variaţiile PP-azei anorganice din omogenatul de ficat de şobolan în prezenţa $MgSO_4$ $4 \cdot 10^{-1}$ M şi EDTA $5 \cdot 10^{-2}$ M

	pH 5,6	pH 4,4
	μmoli PP/100 mg/15' ţesut proaspăt	μmoli PP/100 mg/15' ţesut proaspăt
Omogenat	5,2±0,1	4,6±0,2
Omogenat + EDTA	5,2±0,1	2,3±0,1
Omogenat + EDTA + $MgSO_4$	1,9±0,1	0
Omogenat + $MgSO_4$	7,2±0,1	0

Tabela 3

Variaţiile activităţii pirofosfatazei anorganice din mitocondriile de ficat de şobolan, sub influenţa magneziului, la pH 5,6 şi 7,8 (valori medii din 5 determinări)

pH	Fără $MgSO_4$	Cu $MgSO_4$ $4 \cdot 10^{-1}$ IM
	μmoli PP/100 mg/15' ţesut proaspăt	μmoli PP/100 mg /15' ţesut proaspăt
5,6	3,4±0,1	0
7,8	0	0

DISCUŢII

Adăugarea de ioni de magneziu $4 \cdot 10^{-1}$M duce, la pH 4,4, la anihilarea completă a acţiunii enzimatice, iar la pH 5,6 are loc o activare a enzimei, ceea ce este în acord cu datele lui Norberg (citat de Rafter [1]), care arată că pirofosfataza anorganică din omogenat, în mediu acid, este activată de ionul de magneziu, spre deosebire de pirofosfataza din mitocondrii.

Pirofosfataza anorganică din mitocondrii, la pH 5,6, nu necesită pentru activitate prezenţa magneziului exogen. Prin adăugarea acestuia activitatea enzimei este inhibată, aşa cum se observă în tabela 3. Prin folosirea de EDTA $5 \cdot 10^{-2}$M, aşa cum reiese din tabela 2, în prezenţa magneziului exogen s-a obţinut o inactivare a activităţii enzimatice la pH 5,6, probabil prin complexarea lui, şi chiar a unei părţi din magneziul endogen, absolut necesar pentru activitatea enzimatică, căci complexul Mg-PP serveşte drept substrat al acestei enzime. Cohn (citat de Kunitz [7]) consideră că este probabil ca un compus enzimă-fosfat să fie un intermediar în hidroliza pirofosfatului. Luînd în considerare asocierea constantă a magneziului cu ionul fosfat, complexul Mg-PP este substratul folosit de

către enzimă. Compusul enzimă-fosfat este, după Cohn, (citat de Kunitz [7]) un intermediar, iar rolul exact al magneziului în procesul hidrolitic rămîne încă neclar [7].

Alte date în favoarea ipotezei că Mg-PP este adevăratul substrat au fost prezentate și de Bloch — Frankenthal [8], care au folosit enzima eritrocitară, dar problema trebuie încă să fie considerată deschisă.

Determinările în mediul alcalin, în tampon TRIS-maleat 0,2 M, pH 7,8, au arătat că enzima nu este activă decît în prezența ionilor de Mg exogen, fapt ce a determinat pe Börnig [9] să denumească enzima cu pH optim în mediu alcalin pirofosfataza anorganică dependentă de magneziu.

Rezultatele noastre referitoare la activitatea pirofosfatazei anorganice din omogenatul de ficat la pH 5,6 și 7,8 vin în sprijinul ipotezei că complexul Mg-PP servește drept substrat pentru această enzimă. Totuși, în cazul activității aceleiași enzime la pH 4,4 importanța acestui complex este neclară, Mg exogen inhibînd-o la o concentrație de $4 \cdot 10^{-1}$ M.

Nordlie [4] arată că, la nivelul omogenatului de rinichi și al microzomilor, CTP-glucozo-fosfotransferaza anorganică și pirofosfat-glucozofosfotransferaza sînt inhibate la pH acid, între 4 și 6, de cationii bivalenți, în special de ionul de magneziu.

O analiză diferențiată, cinetică, pentru diferite pirofosfataze din diferite fracțiuni celulare, în vederea lămuririi acestor mecanisme, este în curs de efectuare.

CONCLUZII

Pirofosfataza anorganică este o enzimă care prezintă diferite maxime de activitate, în funcție de variațiile concentrației ionilor de hidrogen și magneziu.

Ionii de magneziu pot activa sau inhiba enzima, în funcție de variațiile de pH și localizarea intracelulară a activității enzimatice. La pH 5,6, enzima este activată de ionul de magneziu, iar la pH 4,4 ea este inhibată.

La nivel mitocondrial, magneziul inhibă activitatea enzimatică, iar la nivelul omogenatului el activează enzima la pH 5,6.

Mulțumim prof. Abaței Leonid pentru ajutorul acordat în executarea acestei lucrări.

Prezentată la redacție la 8 martie 1969

Laboratorul de biochimie și
Laboratorul de anatomie I.M.F., Iași

BIBLIOGRAFIE

1. G. W. Rafter, J. biol. Chem., 230, 2 (1958).
2. G. W. Rafter, J. biol. Chem., **235**, *8*, 2475 (1960).
3. C. R. Nordlie, W. J. Arion, J. biol. Chem., **240**, *5*, 1680 (1964).
4. W. J. Arion, C. R. Nordlie, J. biol. Chem., **239**, *9*, 2755 (1964).
5. C. R. Nordlie, D. G. Lygre, J. biol. Chem, **241**, *13*, 3136 (1966).
6. M. A. Swanson, J. biol. Chem., **194**, 685 (1952).
7. M. Kunitz, *The Enzimes*, vol. 5, ed. a II-a, sub red. P.D. Boyer, H. Lardy, Academic Press, New York — Londra, 1961.
8. Bloch-Frankenthal, Biochem, J., **57**, 87 (1954).
9. A. Horn, N. Börnig, G. Thiele, European J. Biochem., **2**, *2*, 243 (1967).

MAGNESIUM INFLUENCE ON INORGANIC PYROPHOSPHATASE ACTIVITY IN RAT LIVER

SUMMARY

The authors followed the magnesium influence on inorganic pyrophosphatase activity in rat liver homogenate and mitochondria at various pH values (4.4, 5.6 and 7.8). Exogenous magnesium activates the inorganic pyrophosphatase at pH 5.6 in the homogenates but not in the mitochondria.

At pH 4.4 exogenous magnesium inhibits enzymatic activity.

At pH 7.8 the enzyme is active only in the presence of magnesium ions.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 31–35, (1970)

EXOSMOZA AMINOACIZILOR LIBERI DIN PIELEA VERTEBRATELOR ÎN SCARA FILOGENETICĂ

MIOARA CÂRSTEANU

Rezumat. — În această lucrare, autorul a urmărit exosmoza aminoacizilor liberi din pielea unor vertebrate pe scară filogenetică din clasele peşti, amfibii, reptile, păsări şi mamifere.

Separarea aminoacizilor s-a făcut prin cromatografie descendentă pe hîrtie, urmată de determinări fotometrice. Rezultatele obţinute arată că exosmoza aminoacizilor în acest caz se corelează cu criteriile taxonomice de clasificare biologică a vertebratelor în scara filogenetică.

Prezintă interes exosmoza de prolină, care creşte de la vertebratele superioare spre cele inferioare.

Evoluţia organismelor pluricelulare a avut drept consecinţă şi complexarea fazei extracelulare atît din punctul de vedere al compoziţiei chimice cît şi al rolului său biochimic. Una din căile sale de dezvoltare a condus la formarea ţesutului conjunctiv, în care colagenul este componenta predominantă.

Cercetări făcute în acest sens au arătat, pe lîngă unele constante fizico-chimice caracteristice structurii colagenului în toată scara filogenetică, precum şi colagenului din diferite ţesuturi [1], [2], [3], [4], o serie de deosebiri caracteristice anumitor specii [5], [6].

Pe de altă parte, literatura de specialitate semnalează diferite ipoteze privind factorii care determină stabilitatea structurală a colagenului în scara filogenetică [7, [8], [9]. Este demn de reţinut faptul că toate aceste ipoteze se sprijină pe rolul jucat de unii sau de mai mulţi aminoacizi care intră în compoziţia biochimică a colagenului.

Deoarece într-o serie de lucrări anterioare (unele publicate [10], altele sub tipar) am constatat că pielea umană poate ceda aminoacizi cînd este imersată într-o soluţie fiziologică, că aminoacizii exosmozaţi în diferite maladii ale colagenului diferă calitativ şi cantitativ, fapt care pune problema unei modificări în metabolismul colagenului, condiţionată de relaţii biochimice locale, în speţă a unei autonomii relative a metabolismului colagenului, am considerat că cercetarea exosmozei aminoacizilor din straturile profunde ale pielii vertebratelor în filogenie va putea lămuri unele aspecte teoretice în ceea ce priveşte structura şi biosinteza colagenului în pielea normală; acest fapt ne va înlesni şi cunoaşterea modificărilor biochimice la nivelul colagenului din pielea umană în unele maladii specifice.

Ca și în lucrările precedente, am ales ca metodă de investigație a aminoacizilor liberi din piele metoda exosmozei, deoarece cu ajutorul ei putem surprinde unele aspecte ale metabolismului aminoacizilor, fără ca materialul biologic să sufere modificări morfo-chimice rezultate din prelucrarea analitică.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele au fost efectuate pe fragmente de piele normală, excizată de la crap (clasa pești) broască (*Rana esculenta*) și triton (clasa amfibii), șarpe și broască țestoasă (clasa reptile), porumbel și găină (clasa păsări) și de la șobolan (clasa mamifere). Dimensiunile acestor fragmente au fost de 3 cm lungime și 0,5 cm lățime, greutatea lor variind în limite largi în funcție de specia vertebratelor.

Imediat după excizare, fragmentul de piele, curățit de urmele exterioare de sînge, a fost imersat în 10 ml soluție fiziologică Tyrode și păstrat astfel 24 de ore la 4°C. După acest timp, soluția fiziologică în care s-a produs exosmoza aminoacizilor a fost deproteinizată cu o soluție de acid tricloracetic 30% și centrifugată 10 min la 4 000 rot/min. Supernatantul limpede a fost trecut pe o coloană schimbătoare de ioni.

Absorbția aminoacizilor pe coloană de Zerolit 225. Aminoacizii liberi din soluția tricloracetică au fost reținuți pe o coloană de Zerolit 225 (SRC 10) 4—5% DVB, 52—100 mesh de 0,9 × 10 cm. Debitul de curgere a fost de 2 ml/min.

Pentru îndepărtarea substanțelor nereținute (ioni, glucide, acizi organici, lipide etc.), după introducerea probelor s-au adăugat 50 ml apă distilată, iar eluția aminoacizilor reținuți de rășină a fost efectuată cu 30 ml soluție apoasă de amoniac 5%. Soluția amoniacală a fost colectată cantitativ în capsulă de porțelan și evaporată la sec pe o baie de apă. Reziduul a fost reluat cu 3—5 ml apă distilată și evaporat din nou, pentru îndepărtarea urmelor de amoniac.

După eluția aminoacizilor, coloanele de Zerolit au fost regenerate, trecîndu-se succesiv 25 ml apă distilată, 50 ml HCl N și apoi din nou apă distilată, pînă la reacție neutră.

Cromatografia descendentă pe hîrtie a aminoacizilor. Reziduul din capsule a fost reluat cu 0,20 ml izopropanol 10%, din care s-au aplicat probe de 50 µl pe hîrtie Whatman nr. 1. Lichidul de irigare folosit a fost format din butanol : apă : acid acetic glacial (11 : 11 : 3). Spoturile au fost puse în evidență prin pulverizare cu ninhidrină 0,3% în alcool etilic, iar dezvoltarea culorii a avut loc la temperatura camerei și la întuneric. Pentru precizarea identificării spoturilor au fost efectuate reacții specifice pentru histidină, arginină, serină, treonină și prolină. Pe hîrtia Whatman s-au aplicat, pe lîngă probele de cercetat, și probe-martor de 10 µl dintr-o soluție 0,01 M a aminoacizilor cercetați.

După 18 ore de la pulverizare cu ninhidrină, spoturile individuale ale aminoacizilor s-au decupat și s-au introdus în eprubete. Prin umectarea lor cu o soluție de clorură de cadmiu și ninhidrină în acetonă, aminoacizii au fost transformați într-un complex cu cadmiu [11], care ulterior a fost eluat cu 3 ml alcool metilic, sub agitare puternică. După 10 min, probele au fost fotometrate la 530 mµ. Calculele s-au făcut în funcție de extincțiile aminoacizilor martori decupați de pe aceeași cromatogramă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Deoarece exosmoza aminoacizilor din piele în condiţiile noastre de lucru, se poate produce atît pe suprafaţa externă, cît şi pe suprafaţa, internă a fragmentului de piele excizat şi deoarece straturile exterioare ale pielii prezintă mari deosebiri morfostructurale în scara filogenetică am izolat printr-o peliculă de parafină suprafaţa exterioară de rest. În felul acesta am realizat o exosmoză a aminoacizilor din straturile profunde ale pielii, care interesează ţesutul conjunctiv.

Rezultatele obţinute arată că procesul de exosmoză al aminoacizilor din ţesutul conjunctiv al pielii vertebratelor cercetate se încadrează în criteriile taxonomice de evoluţie a acestora. Într-adevăr, din tabela 1 se

Tabela 1

Exosmoza aminoacizilor liberi din pielea unor vertebrate în filogenie (μ moli/g piele umedă)*

Aminoacizi	Peşti	Amfibii		Reptile		Păsări		Mamifere
	crap	*Rana esculenta*	triton	şarpe	broască ţestoasă	porumbel	găină	şobolan
Acid glutamic	0,252	0,300	0,251	0,262	0,298	0,310	0,330	0,564
Acid aspartic	—	—	—	—	—	—	—	0,381
Serină	—	—	—	—	—	—	—	0,344
Arginină	—	—	—	—	—	—	—	0,322
Alanină	—	—	—	—	—	—	—	0,230
Izoleucină	—	—	—	0,162	0,138	0,128	0,152	0,140
Glicocol	—	0,060	—	—	—	0,060	0,055	0,070
Prolină	0,370	0,290	0,288	0,230	0,230	0,175	0,185	0,100
Lizină	—	—	—	0,135	0,155	0,140	0,155	0,180
Fenilalanină	—	0,060	—	—	—	0,060	0,060	0,040
Acid γ-aminobutiric	—	0,068	0,080	0,070	0,075	0,070	0,070	—

* Valorile indicate în tabelă reprezintă media a 10 —15 determinări pentru fiecare vertebrat.

poate vedea că numărul de aminoacizi exosmozaţi creşte de la peşti la mamifere. La fiecare clasă imediat superioară, în soluţia de exosmoză se regăsesc, pe de o parte, aminoacizii exosmozaţi în clasa imediat inferioară, iar pe de altă parte apar aminoacizi noi, care caracterizează exosmoza la acest nivel a clasei respective. Excepţie face *Rana esculenta*, din clasa amfibiilor, la care exosmoza din piele pune în evidenţă o serie de aminoacizi care o apropie mai mult de clasa păsări.

Aceste rezultate, obţinute în condiţiile noastre de lucru, în care s-a urmărit difuzia aminoacizilor din straturile profunde ale pielii, prin suprafaţa internă a acesteia, în mediul extern creat de noi, atrag totuşi atenţia asupra unei corelaţii între acest fenomen de exosmoză al aminoacizilor din piele în scara filogenetică a vertebratelor şi mediul în care ele trăiesc. Este de remarcat faptul că la vertebratele al căror mediu de viaţă îl constituie apa exosmoza de aminoacizi este foarte redusă (de exemplu la peşti am putut pune în evidenţă cantităţi dozabile numai de acid glutamic şi prolină). Numărul de aminoacizi exosmozaţi creşte în scara vertebratelor studiate de noi pînă la clasa mamifere.

Datele noastre vin în concordanţă cu faptul, semnalat în literatura de specialitate, că numărul total de aminoacizi puşi în evidenţă în cola-

genul peştilor este mult mai redus decît cel determinat în colagenul mamiferelor [12]. Cu toate că balena are ca mediu de viaţă exclusiv mediul acvatic, în colagenul ţesutului său conjunctiv s-a putut pune în evidenţă un număr de aminoacizi caracteristici mamiferelor terestre [13]. Aceste fapte ne fac să credem că rezultatele obţinute de noi în ceea ce priveşte exosmoza aminoacizilor din pielea vertebratelor aflate pe trepte diferite în scara filogenetică se corelează cu criteriile taxonomice ale clasificării lor biologice.

Interesantă de remarcat în cercetarea făcută de noi este exosmoza prolinei din pielea diferitelor vertebrate : în lucrări anterioare privind exosmoza aminoacizilor din pielea umană normală [14] am semnalat că prolina, respectiv hidroxiprolina, a exosmozat din ţesutul conjunctiv în cantităţi foarte mici, cu toate că se ştie că acest aminoacid, împreună cu glicocolul, se găseşte în molecula de colagen în proporţia cea mai ridicată. În lucrarea de faţă însă am constatat că în procesul de exosmoză cantitatea de prolină cedată de piele soluţiei în care aceasta este imersată creşte de la vertebratele superioare studiate de noi spre cele inferioare, cantităţile cele mai mari găsindu-se la peşti.

Dacă luăm în considerare cercetările făcute de unii autori [15], [16], în care se arată că prolina liberă este sursa prolinei şi hidroxiprolinei din molecula colagenului şi că hidroxilarea are loc după ce prolina a fost încorporată în lanţurile polipeptidice ale colagenului, am putea presupune că acest proces nu mai este identic pe toată scara filogenetică a vertebratelor şi că, eventual, căile de metabolizare a colagenului sînt diferite la vertebratele inferioare faţă de cele superioare, cel puţin la speciile cercetate de noi.

Pe de altă parte, rezultatele noastre pot sugera ideea existenţei unui sistem diferit de difuzie a aminoacizilor, sau a anumitor aminoacizi, din pielea vertebratelor inferioare faţă de acela al vertebratelor superioare, în funcţie de mediul în care ele trăiesc, sistem care anagajează chiar şi straturile profunde ale pielii. Mai mult chiar, ar putea fi vorba de o permeabilitate a ţesuturilor dermice, adaptată la mediul de viaţă caracteristic unei anumite clase de vertebrate, ipoteză pentru care pledează şi faptul că, în ceea ce priveşte conţinutul său, prolina este unul din aminoacizii constituenţi ai colagenului care prezintă cel mai mic grad de variaţie în scara filogenetică.

CONCLUZII

Exosmoza aminoacizilor din pielea vertebratelor în filogenie poate să reflecte unele aspecte ale metabolismului aminoacizilor din piele. Considerăm că datele obţinute în această lucrare vor constitui premisa pentru cercetări viitoare, în care să putem lămuri mai precis unele aspecte cu privire la căile de metabolism ale colagenului în pielea normală şi patologică.

Prezentată la redacţie la 17 iulie 1969

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. R.S. Bear, Advanc. Protein Chem., **7**, 69 (1952).
2. W. F. Harrington, P. H. Won Hippel, Advanc. Protein Chem., **16**, 1 (1961).
3. M. H. Marks, R. S. Bear, C. H. Blake, J. exp. Zool., **111**, 55 (1949).
4. J. Gross, Z. Sokal, M. Rugvie, J. Histochem. Cytochem., **4**, 227 (1956).
5. N. E. Kemp, Develop. Biol., **1**, 459 (1959).
6. V. Mizuhira, Arch. Histol., **2**, 445 (1951).
7. R. E. Burge, E. D. Hynes, J. mol. Biol., **1**, 155 (1959).
8. W. F. Harrington, Nature, **181**, 997 (1958).
9. K. A. Piez, J. Gross, J. biol. Chem., **235**, 995 (1960).
10. R. Dumitru, Mioara Cârsteanu, Rev. roum. Biochim., **5**, 107 (1968).
11. J. Barrollier, Naturwissenschaften, **42**, 416 (1955).
12. J. Gross, în M. Florkin, *Comparative Biochemistry*, Academic Press, New York — Londra, 1965, p. 307.
13. J. E. Eastoe , A. A. Leach, în *Recent Advances in Gelatin and Glue Research*, Pergamon Press, New York, 1958, p. 173.
14. D. Fujimoto, E. Adams, Biochim. biophys. Acta, **107**, 232 (1965).
15. K. Konno, T. Tetsuka, J. Biochem., **56**, 581 (1964).
16. E. Hansman, W. F. Neuman, J. biol. Chem., **236**, 149 (1961).

THE EXOSMOSIS OF FREE AMINOACIDS FROM VERTEBRATE SKIN IN PHYLOGENESIS

SUMMARY

The exosmosis of free aminoacids from the skin in the phylogeny of vertebrates (viz. fishes, amphibia, reptiles, birds, mammals) was pursued.

The aminoacids separation on paper descendent chromatography followed by photometrical determinations was made. The results show that the exosmosis of aminoacids is correlated with the taxonomic criteria of biological classification of vertebrates in the phylogenesis.

The increase of proline exosmosis from the higher vertebrates to the lower ones is of interest.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 37–45, (1970)

ACȚIUNEA INHIBITOARE A IONILOR DE LITIU ASUPRA ACTIVITĂȚII PIROFOSFATAZEI

ELENA HADARAG

Rezumat. — Se cercetează acțiunea ionilor Li^+, Na^+, K^+ asupra pirofosfatazei eritrocitare și cerebrale.

Litiul exercită o puternică inhibiție competitivă asupra pirofosfatazei eritrocitare și cerebrale. Inhibiția sodiului este foarte redusă și de tip necompetitiv, iar potasiul are o acțiune nesemnificativă. Constanta Michaelis crește sub influența ionilor de litiu, iar afinitatea enzimei pentru substrat scade. Din variațiile lui K_i reiese că ionii Li^+ manifestă o afinitate mai mare pentru pirofosfataza din țesutul cerebral, comparativ cu aceea din eritrocite. Afinitatea ionilor Na^+ pentru această enzimă este extrem de scăzută.

Se sugerează o corelație între efectul inhibitor al litiului asupra pirofosfatazei și acțiunea sa terapeutică, în special în tulburările nervoase.

Pirofosfataza (pirofosfat-fosfohidrolaza) este o enzimă importantă, întrucît intervine în numeroase reacții metabolice care eliberează pirofosfat, de exemplu: activarea aminoacizilor, biosinteza nucleotidelor și a nucleozid-polifosfaților, sinteza ARN și ADN etc. În aceste reacții reversibile, deplasarea echilibrului chimic în sensul sintezei sau degradării diverșilor compuși este condiționată de concentrația în pirofosfat. Reglarea concentrației pirofosfatului are loc sub acțiunea pirofosfatazei anorganice, care scindează pirofosfatul în două molecule de ortofosfat. Desfacerea legăturii anhidridice fiind o reacție exergonică, sub acțiunea pirofosfatazei rezultă o cantitate apreciabilă de energie, necesară fenomenelor vitale.

În afară de rolul pe care îl are în procesele metabolice, pirofosfataza participă și la reacțiile de schimb ionic. Desfacerea pirofosfatului în două molecule de ortofosfat provoacă o dublare a valorii presiunii osmotice, asigurînd astfel gradientul osmotic necesar circulației ionilor de o parte și de alta a membranelor.

Datorită importanței sale biologice, pirofosfataza a făcut obiectul preocupărilor noastre, cu care ocazie am constatat o serie de particularități interesante.

O caracteristică a acestei enzime este că ea poate fi inhibată de unele metale ușoare, cu masa atomică sub 50, care de obicei sînt activatoare.

Rezultatele obținute ne-au atras atenția în mod deosebit asupra inhibiției exercitate de litiu, deoarece acesta este foarte rar citat în literatură ca inhibitor enzimatic (4 cazuri) și nu se cunoaște pînă azi nici o enzimă din clasa hidrolazelor care să fie inhibată de acest element.

Interesul pentru cercetarea efectului inhibitor al litiului a crescut în ultimul timp, mai ales datorită acţiunii sale specifice în tratamentul unor maladii nervoase la om.

Primele observaţii referitoare la acţiunea litiului asupra organismelor vii se datoresc lui Cade [3]. Astfel, în 1949, autorul semnalează că litiul produce o letargie specifică la cobai. El sugerează ideea utilizării sărurilor de litiu în tratamentul maladiilor nervoase. În urma acestei sugestii, diverşi cercetători au folosit compuşii cu litiu în afecţiunile maniaco-depresive la om, obţinînd însă rezultate discutabile.

Controversele în acest sens apărute în lucrările publicate au fost minuţios analizate de Baastrup şi Schou [1], care în urma unor numeroase cercetări clinice ajung la concluzia că litiul este un agent profilactic împotriva uneia din principalele psihoze, avînd o acţiune de necontestat în această maladie. În prezent, litiul se utilizează cu rezultate favorabile în prevenirea acceselor maniaco-depresive, prin administrare zilnică de doze cuprinse între 0,5 şi 1,5 g $LiCO_3$ (6,7 — 20 miliechivalenţi Li) sub control medical. Tratamentul este contraindicat la cardiaci şi la cei cu afecţiuni renale, deoarece litiul se acumulează în ţesuturi, provocînd intoxicaţii periculoase.

Modul de acţiune al litiului nu este pe deplin cunoscut, dar se presupune că el intervine în procesele de transport activ, modificînd eficienţa pompei de sodiu prin influenţa exercitată asupra ATP-azei din membrana celulară.

Furnizarea energiei de transport de către sistemul enzimatic respectiv necesită ioni de sodiu şi potasiu pentru orientarea spaţială asimetrică a proteinei active, ionii de sodiu fiind dirijaţi la interior, iar cei de potasiu la exterior. Intervenţia altor ioni poate strica starea de echilibru necesară unei funcţionări normale a pompelor celulare, provocînd acumularea lor în interiorul celulelor.

Presupunem că această acumulare poate influenţa anumite sisteme enzimatice, ducînd la modificarea tipului de metabolism. De aceea, am urmărit efectul ionilor de litiu asupra activităţii unor enzime cu rol major în procesele metabolice esenţiale, între care şi pirofosfataza. Cercetări mai amănunţite am efectuat în acest sens asupra pirofosfatazei cerebrale, pe de o parte datorită efectului terapeutic al litiului în diferite psihoze, iar pe de altă parte datorită rolului important pe care această enzimă îl are în procesele biochimice din creier.

Încă din 1963, Crighel — Mison şi colab. [4] semnalează variaţia activităţii pirofosfatazei cu ocazia cercetărilor asupra insuficienţei circulatorii cerebrale acute.

Buruiană şi Hadarag [2] arată că activitatea enzimatică şi polimorfismul molecular al pirofosfatazei cerebrale scad cu vîrsta animalelor.

În prezenta lucrare redăm cîteva rezultate cu privire la acţiunea exercitată de litiu asupra pirofosfatazei din unele ţesuturi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Ca sursă de enzimă s-au utilizat eritrocitele şi creierul de la diferite specii de animale. Hemolizatul, obţinut prin liza globulelor roşii în soluţii hipotonice, şi extractul de ţesut cerebral, rezultat în urma triturării şi

omogenizării ţesutului cu soluţie tampon TRIS, pH 7,0 — 7,2, ne-au servit ca soluţii enzimatice.

Experienţele s-au efectuat în absenţa şi în prezenţa unor cantităţi variabile de LiCL. Pentru comparaţie s-a urmărit şi efectul ionilor Na^+ şi K^+. Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabelele 1 şi 2.

Tabela 1

Influenţa ionilor monovalenţi (Li+, Na+, K+) asupra pirofosfatazei eritrocitare

Concentraţia efectorului	Inhibiţia %		
	LiCl	NaCl	KCl
0,375 M	92,7	11,7	0
0,187 M	78,5	5,8	0
0,125 M	57,3	3,9	0
0,075 M	34,4	2,6	0
0,062 M	28,4	0	0
0,025 M	11,4	0	0

Tabela 2

Influenţa ionilor monovalenţi (Li+, Na+, K+) asupra pirofosfatazei cerebrale

Concentraţia efectorului	Inhibiţia %		
	LiCl	NaCl	KCl
0,750 M	100,0	57,1	62,0
0,500 M	99,3	30,0	56,0
0,125 M	96,8	0	8,5
0,067 M	64,1	0	0
0,037 M	50,0	0	0
0,013 M	40,6	0	0

Din tabele se remarcă efectul puternic inhibitor al litiului asupra pirofosfatazei eritrocitare şi cerebrale. Ionii de sodiu manifestă o acţiune inhibitoare mult mai redusă. Ionii de potasiu nu au nici o activitate asupra pirofosfatazei eritrocitare, inhibînd însă puţin pirofosfataza cerebrală.

În scopul de a obţine informaţii mai ample cu privire la acţiunea exercitată de aceşti ioni, am determinat tipul de inhibiţie prin metoda Lineweaver şi Burk [7], urmărind şi efectul asupra constantei Michaelis (K_m) şi a afinităţii enzimei pentru substrat ($1/K_m$). De asemenea, s-au calculat constanta de inhibiţie (K_i) şi afinitatea inhibitorului pentru enzimă ($1/K_i$), recurgîndu-se, după caz, la procedeul Dixon [5], Hunter şi Downs [6] etc.

Graficele din figurile 1—3 demonstrează că, pentru toate concentraţiile sărurilor cu care s-a experimentat, inhibiţia provocată de litiu este competitivă, pe cînd slaba inhibiţie produsă de sodiu este necompetitivă.

Sub acţiunea inhibitoare a ionilor de litiu, constanta Michaelis creşte, scăzînd astfel afinitatea enzimei pentru substrat. La pirofosfataza cerebrală, pentru concentraţii crescînde de LiCl se remarcă valori ale constantei Michaelis de 2—4 ori mai mari decît cea obţinută în absenţa litiului. În tabelele 3 şi 4 redăm modificările constantei Michaelis şi afinităţii sub influenţa ionilor Li^+.

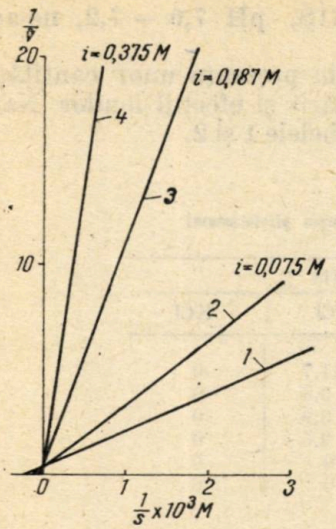


Fig. 1. — Inhibiția competitivă produsă de litiu asupra pirofosfatazei eritrocitare:
1 — fără LiCl; *2* — cu LiCl 0,075 M; *3* — cu LiCl 0,187 M; *4* — cu LiCl 0,375 M.

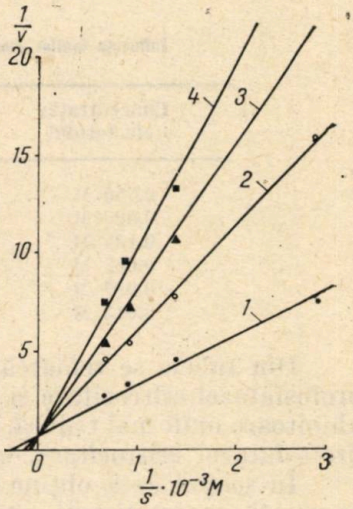


Fig. 2. — Inhibiția competitivă produsă de litiu asupra pirofosfatazei cerebrale:
1 — fără LiCl; *2* — cu LiCl 0,013 M; *3* — cu LiCl 0,037 M; *4* — cu LiCl 0,067 M.

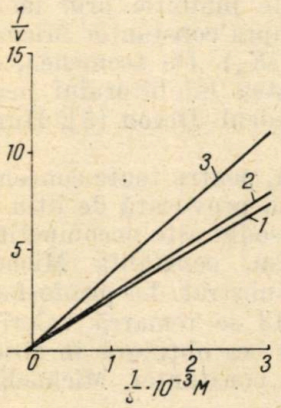


Fig. 3.— Inhibiția necompetitivă produsă de sodiu asupra pirofosfatazei eritrocitare:
1 — fără NaCl; *2* — cu NaCl 0,375 M; 3 — cu NaCl 0,750 M.

Inhibiţia provocată de sodiu fiind necompetitivă, constanta Michaelis nu se modifică şi deci afinitatea enzimei pentru substrat rămîne aceeaşi. Efectul ionilor de sodiu se manifestă asupra stabilităţii complexului pirofosfatază-pirofosfat, şi nu asupra afinităţii enzimei faţă de substrat.

Tabela 3

Influenţa ionilor de Li^+ asupra constantei Michaelis (K_m) şi afinităţii ($1/K_m$) în cazul pirofosfatazei eritrocitare

Concentraţia molară în LiCl	$K_m \times 10^{-3}$ M	$1/K_m \times 10^{-3}$ M
—	4,4	0,225
0,075 M	8,0	0,125
0,187 M	20,0	0,050
0,375 M	40,0	0,025

Tabela 4

Influenţa ionilor de Li+ asupra constantei Michaelis (K_m) şi afinităţii ($1/K_m$) în cazul pirofosfatazei cerebrale

Concentraţia molară în LiCl	$K_m \times 10^{-3}$ M	$1/K_m \times 10^{-3}$ M
—	3,33	0,300
0,013 M	7,10	0,140
0,037 M	10,10	0,100
0,067 M	12,50	0,080

În figurile 4 — 6 redăm graficul Dixon pentru acţiunea inhibitoare a litiului şi sodiului.

Constanta de inhibiţie (K_i) nu a putut fi determinată totdeauna prin metoda Dixon. În figura 4 curbele Dixon au alura unor exponenţiale, şi nu a unor drepte, ca de obicei. În asemenea situaţii am calculat pe K_i folosind relaţia :

$$K_i = \frac{I}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$$

în care : I = concentraţia în inhibitor, K_p = constanta Michaelis în prezenţa inhibitorului, K_m = constanta Michaelis în absenţa inhibitorului.

Din figura 6 se observă că, curbele Dixon trasate pentru acţiunea inhibitoare a sodiului asupra pirofosfatazei se întîlnesc foarte departe pe axa absciselor, ceea ce demonstrează că afinitatea sodiului pentru proteina enzimatică este foarte mică comparativ cu aceea a litiului.

Pentru calcularea lui K_i n-am putut folosi relaţia de mai sus, întrucît, inhibiţia provocată de sodiu fiind competitivă, constanta Michaelis nu se schimbă, deci $K_p = K_m$. În acest caz am recurs la metoda grafică Hunter şi Downs, după cum se vede în figura 7.

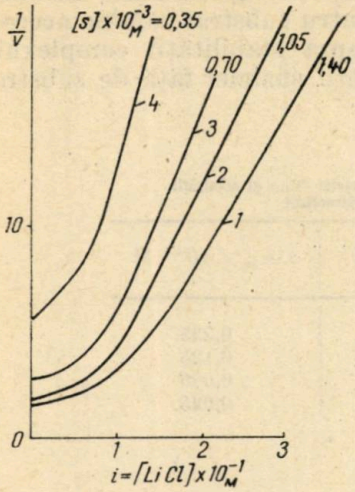


Fig. 4. — Graficul Dixon pentru inhibiția produsă de litiu asupra pirofosfatazei eritrocitare :

1 — concentrația în substrat 1,40 × 10^{-3} M; *2* — concentrația în substrat 1,05 × 10^{-3} M; *3* — concentrația în substrat 0,70 × 10^{-3} M; *4* — concentrația în substrat 0,35 × 10^{-3} M.

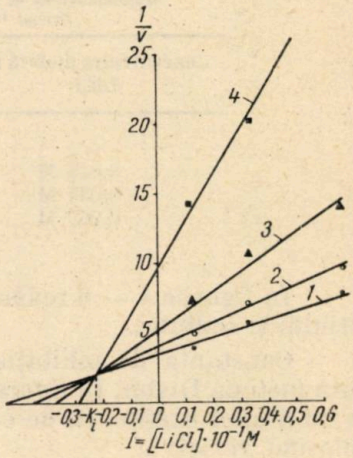


Fig. 5. — Graficul Dixon pentru inhibiția produsă de litiu asupra pirofosfatazei cerebrale :

1 — concentrația în substrat 1,40 × 10^{-3} M; *2* — concentrația în substrat 1,05 × 10^{-3} M; *3* — concentrația în substrat 0,70 × 10^{-3} M; *4* — concentrația în substrat 0,35 × 10^{-3} M.

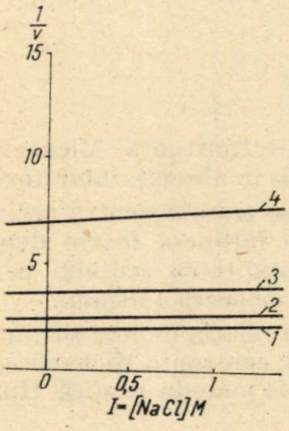


Fig. 6. — Graficul Dixon pentru inhibiția produsă de sodiu asupra pirofosfatazei eritrocitare :

1 — concentrația în substrat 1,40 × 10^{-3} M; *2* — concentrația în substrat 1,05 × 10^{-3} M; *3* — concentrația în substrat 0,70 × 10^{-3} M; *4* — concentrația în substrat 0,35 × 10^{-3} M.

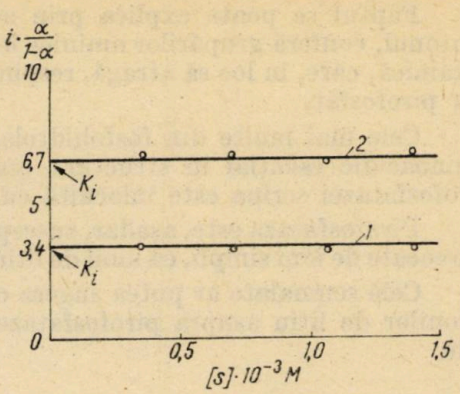


Fig. 7. — Graficul Hunter şi Downs pentru inhibiţia produsă de sodiu asupra pirofosfatazei eritrocitare : *1* — cu NaCl 0,375 M; *2* — cu NaCl 0,750 M.

Rezultatele sînt redate spre comparaţie în tabela 5.

Din valorile obţinute pentru K_i şi $1/K_i$ reiese că ionii de litiu manifestă o afinitate mai mare pentru pirofosfataza din ţesutul cerebral comparativ cu aceea din eritrocite. Afinitatea ionilor de sodiu pentru această enzimă este extrem de scăzută.

Tabela 5

Valorile lui K_i şi $1/K_i$ în cazul inhibiţiei produse de ionii de Li+ şi Na+ asupra pirofosfatazei

INHIBITORUL	Concentraţia molară a inhibitorului	$K_i \times 10^{-1}$M	$1/K_i \times 10^{-1}$M	PRODUSUL BIOLOGIC
LiCl	0,075 M	0,93	1,08	ERITROCITE
	0,187 M	0,53	1,90	
	0,375 M	0,46	2,09	
	0,013 M	0,12	8,33	CREIER
	0,037 M	0,16	6,25	
	0,062 M	0,24	4,17	
NaCl	0,375 M	34,00	0,03	ERITROCITE
	0,750 M	67,00	0,02	

Ionii de litiu, combinîndu-se cu uşurinţă cu enzima, exercită o acţiune puternic inhibitoare, mai ales asupra pirofosfatazei cerebrale, pe cînd ionii de sodiu, avînd afinitate scăzută, provoacă o mică inhibiţie.

DISCUŢII

Scăderea activităţii pirofosfatazei şi schimbarea cineticii ei sub acţiunea litiului dovedesc că acest element are un efect specific asupra enzimei. Deşi raza atomică a litiului şi sarcina sa electrică sînt reduse, totuşi el poate deforma edificiul macromolecular al proteinei active.

Faptul se poate explica prin aceea că ionii de litiu, întocmai ca protonul, conferă grupărilor aminice legate coordinativ de azot o structură betainică, care, în loc să atragă, respinge electronii de valenţă ai fosforului din pirofosfat.

Cele mai multe din fosfohidrolazele obişnuite conţin serină ca rest aminoacidic esenţial în structura centrilor activi [8], pe cînd în cazul pirofosfatazei serina este înlocuită cu aminoacizi bazici (probabil lizină).

Pirofosfataza este, aşadar, susceptibilă de modificări conformaţionale provocate de ioni simpli, ca ionii de litiu.

Cele semnalate ar putea sugera o corelaţie între acţiunea inhibitoare a ionilor de litiu asupra pirofosfatazei şi rolul terapeutic al sărurilor de litiu.

CONCLUZII

1. Pirofosfatazele eritrocitară şi tisulară sînt inhibate de unele metale uşoare, cu masa atomică sub 50, care de obicei sînt activatoare.

2. În seria metalelor alcaline, inhibiţia scade cu cît caracterul electropozitiv se accentuează. Astfel, litiul are un efect puternic inhibitor, sodiul este slab inhibitor, iar potasiul nu are acţiune sau inhibă foarte puţin pirofosfataza.

3. Inhibiţia provocată de litiu este competitivă, pe cînd cea exercitată de sodiu este necompetitivă.

4. Sub acţiunea ionilor de litiu, constanta Michaelis creşte, iar afinitatea enzimei pentru substrat scade. În cazul inhibiţiei produse de sodiu, constanta Michaelis nu se schimbă.

5. Ionii de litiu manifestă o afinitate mai mare pentru pirofosfataza din ţesutul cerebral comparativ cu aceea din eritrocite. Afinitatea ionilor de sodiu pentru pirofosfatază este extrem de scăzută.

6. Rezultatele obţinute ar putea explica acţiunea terapeutică a litiului prin inhibiţia enzimatică şi modificarea tipului de metabolism din ţesutul nervos.

Prezentată la redacţie la 9 iulie 1969

Facultatea de medicină veterinară, Institutul agronomic „N. Bălcescu", Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Baastrup P. C., Schou M., Arch. gen. Psychiat. (Chicago), **16**, 162 — 172 (1967).
2. Buruiană L. M., Hadarag El., Enzymologia, **36**, 73—78 (1969).
3. Cade J. F. J., citat după Blackwell B. şi Shepherd, Lancet, *7549*, 968—971 (1968).
4. Crighel-Mison N., Crighel E., Costa-Foru D., St. cerc. neurol., **VIII**, *1*, 105 — 115 (1963).
5. Dixon M., Webb E., *Enzymes*, Second Edition Longmans, Green and Co LTD, 48 Grosvenor Street, London, W. I, 1964, p. 79 — 81, 195, 315, 454, 616, 758 — 759, 806.
6. Hunter A., Downs C. F., J. biol. Chem., **157**, 427 (1945).
7. Lineweaver H., Burk D., J. amer. chem. Soc., **56**, 658 (1934).
8. Pfleiderer G., Naturwiss enschaften, **54**, 632 (1967).

THE INHIBITORY EFFECT OF LITHIUM SALTS UPON THE PYROPHOSPHATASE ACTIVITY

SUMMARY

The effect of Li^+, Na^+, K^+ ions on erythrocyte and brain pyrophosphatase is investigated.

Lithium produces a high competitive inhibition on the erythrocyte and brain pyrophosphatase activity. The Na^+ ion inhibition is non-competitive and low, while that of the K^+ ion is absent.

In the presence of lithium the Michaelis constant increases, while the enzyme affinity decreases. The values of the inhibitor constants (K_i) show that lithium ions have a greater affinity for the brain pyrophosphatase as compared to the erythrocyte pyrophosphatase. The affinity of the Na^+ ions is very small.

A relationship is suggested between the inhibitory effect of the lithium salts upon the brain pyrophosphatase activity, and their therapeutic action in manic depressive treatment.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 47–53, (1970)

PEROXIDAZA DIN PORUMB ÎN PRIMELE ETAPE DE CREŞTERE

IOANA HAGIMA-CĂLIN

Rezumat. — Lucrarea prezintă un tablou al peroxidazei din porumb în primele 18 zile de la începerea germinării.
Activitatea peroxidazică a formaţiunilor seminţei negerminate este foarte slabă. Germinarea determină o creştere a activităţii pînă în ziua a 6-a. Rădăcinile conţin o activitate peroxidazică de 2,5 ori mai mare decît tulpina. Peroxidaza din plantule şi frunze este localizată cu precădere în restul celulei comparativ cu sucul vacuolar. O dată cu germinarea au loc schimbări în spectrul formelor moleculare ale enzimei în primele 6 zile. Formele moleculare ale peroxidazei din frunze sînt legate de apariţia ei ca organ, şi nu şi de procesul de fotosinteză.

Peroxidaza din porumb a mai făcut obiectul unor cercetări sub aspectul formelor moleculare din ţesuturi. Astfel, prin electroforeza în gel de amidon s-au evidenţiat formele prezente în teaca frunzelor [1] sau în frunze, tulpină, rădăcină, scoarţă, mătase, ştiuleţi tineri, nematuri, şi polen [2]. Prin electroforeza în gel de agar s-au evidenţiat fracţiunile existente în extracte de frunze şi cloroplaste [3], în formaţiunile seminţei în repaus [4], [5] şi după germinare, cînd tulpina a atins 5 cm [6].

Lucrarea de faţă prezintă un tablou al peroxidazei din porumb în primele 18 zile de la începerea germinării. S-a urmărit dinamica peroxidazei, atît din punct de vedere cantitativ, prin determinarea intensităţii activităţii ei în formaţiunile seminţei negerminate, în perioada germinării şi în primele frunze, cît şi calitativ : evoluţia ei sub raportul prezenţei în aceste etape a unor forme moleculare separabile pe cale electroforetică. Pentru aceasta s-au examinat extractele diverselor ţesuturi, iar la plantule şi frunze şi sucul lor vacuolar.

MATERIALE ŞI METODE

Cercetarea s-a efectuat pe porumb H. D. 336 obţinut de la I.C.C.P.T. — Fundulea. S-a lucrat pe formaţiunile seminţei, separate manual din boabele înmuiate iniţial 3—4 ore în apă de robinet. După uscare la temperatura camerei, endospermii s-au măcinat şi s-au trecut printr-o sită de 0,4 mm, iar acşii embrionari şi scutelii s-au mojarat. Seminţele, dezinfectate cu o soluţie de 3% apă oxigenată, s-au germinat pe hîrtie de filtru, în cutii Petri, la întuneric. La 2, 4, 6 şi 9 zile s-au separat plantula (tulpiniţa plus rădăcinile), scutelul şi endospermul şi s-au analizat.

Frunzele s-au obţinut din plante crescute în lăzi cu pămînt, la lumină artificială şi la temperatura camerei, recoltîndu-se după 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare, adică 8, 10, 12 şi 15 zile de la răsărire. S-a lucrat şi pe frunze etiolate, crescute la întuneric.

Extracţia s-a făcut cu NaCl 9‰ în următoarele proporţii (ml extract : g/material) : 2 : 1 pentru făina din endospermul în repaus sau 1,5 : 1 după germinare, 5 : 1 pentru scutelul în repaus sau după germinare, 10 : 1 pentru axul negerminat sau 1 : 1 după germinare şi 0,4 : 1, pentru frunze. Extracţia s-a efectuat timp de 1 oră la temperatura camerei şi a fost urmată de centrifugarea extractelor la rece, la 4500 g, timp de 15 min. Determinarea activităţii peroxidazei s-a făcut în ziua extracţiei, iar electroforeza a doua zi, din aceleaşi supernatante sau, ulterior, din preparatele proteice brute liofilizate.

Sucul vacuolar din plantule şi din frunze s-a obţinut prin presare la 150 atm, cu o presă Hafico [7].

Electroforeza s-a efectuat în gel de agar, 1,5% (Special Agar Noble-Difco Laboratories), cu tampon de acid boric 0,2 M-borax 0,05 M, pH 8,2, pe plăci de 15 × 3 cm, timpul de migrare fiind de 5 ore; pentru plăci s-a utilizat acelaşi tampon, diluat cu două părţi de apă distilată. S-a lucrat la 180 V, cu 0,5 mA/cm. Activitatea peroxidazică s-a evidenţiat după electroforeză prin imersarea plăcilor timp de 3—5 min într-o soluţie saturată de guaiacol în tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH 5, urmată de trecerea lor într-o soluţie de apă oxigenată 0,1% în apă distilată.

Determinarea activităţii peroxidazei s-a făcut prin adaptarea metodei cronometrice a lui Brad şi colab. [8], care se bazează pe principiul metodei date de Bojarkin [9]. Noi trebuia să comparăm activitatea peroxidazică din diferite extracte, iar deoarece în cazul acestei metode activitatea enzimei nu este proporţională cu concentraţia ei decît într-un interval de concentraţie foarte mic, comparaţia s-a făcut pe baza stabilirii diluţiei extractelor la care timpul de oxidare a substratului este aproximativ acelaşi. În unele cazuri, cînd activităţile peroxidazice erau foarte apropiate, s-a recurs la o curbă care arată raportul dintre activitatea enzimatică şi timpul de oxidare a unei cantităţi fixe de substrat, potrivit căreia s-au făcut corecţiile respective. Pentru extractele în care activitatea catalazică era foarte puternică (ax embrionar şi scutel negerminat) a fost necesar să se mărească concentraţia apei oxigenate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinarea activităţii peroxidazei. Activitatea peroxidazïcă a extractelor din *axul embrionar, scutelul şi endospermul seminţei de porumb negerminate* este redată în tabela 1.

Se constată că formaţiunile seminţei negerminate au o foarte slabă activitate peroxidazică. Corelînd raportul de extracţie cu cantitatea de extract folosită pentru determinarea activităţii peroxidazice, se observă că pentru 1 g material, luînd ca unitate activitatea endospermului, aceasta este de aproximativ 3,6 ori mai mare în scutel şi şi de 6,2 ori mai mare în axul embrionar.

Tabela 1

Activitatea peroxidazică a formațiunilor seminței de porumb negerminate

Formațiunea	Raport de extracție ml/g	ml în reacție	Număr de secunde necesare oxidării substratului la 37°C	Mărimea activității pentru 1 g material	
				sec	x ori
Ax embrionar	10/1	2	70	350	6,2
Scutel	5/1	1,8	72	200	3,6
Endosperm	2/1	2,5	70	56	1

În perioada germinării, activitatea peroxidazică a *plantulei* (tulpinița plus rădăcinile) crește foarte mult în primele două zile, rămîne de aceeași intensitate după 4 zile, pentru ca să crească din nou în ziua a 6-a. După 9 zile de germinare, plantula evidențiază o activitate intensă, totuși ceva mai mică decît după 6 zile de germinare (tabela 2).

În ziua a 6-a de germinare activitatea peroxidazei s-a urmărit separat la tulpiniță și rădăcini. S-a constatat că rădăcinile evidențiază o mai puternică activitate peroxidazică decît tulpinița. Intensitatea activității tulpiniței este numai aproximativ 40% din aceea a rădăcinilor.

Tabela 2

Activitatea peroxidazică a formațiunilor seminței în timpul germinării

Formațiunea	Zile de germinare	Raport de extracție ml/g	Diluția %	ml în reacție	Număr de secunde necesare oxidării substratului la 37°C
Plantulă	2	1/1	5	1	103
	4	”	5	1	93
	6	”	3,75	1	95
	9	”	4	1	102
Scutel	2	5/1	11	1	90
	4	”	6,6	1	90
	6	”	2,5	1	82
	9	”	4	1	86
Endosperm	2	1,5/1	—	1,5	122
	4	”	—	1,25	118
	6	”	40	1	120
	9	”	25	1	120

Sucul vacuolar obținut din plantule de 6 zile de la germinare evidențiază o activitate peroxidazică ce reprezintă aproximativ 87 % față de a extractului din aceeași perioadă. Aceasta arată că în perioada respectivă peroxidaza este localizată cu precădere în restul celulei (citoplasmă), cu toate că și sucul vacuolar o conține.

Activitatea peroxidazică a *scutelului* crește de asemenea foarte mult în primele două zile de germinare. Această creștere continuă pînă în a 6-a zi de germinare, cînd activitatea enzimei atinge maximul (tabela 2).

Activitatea peroxidazică a *endospermului* este slabă, iar creșterea ei este lentă în toată această perioadă (tabela 2).

Frunzele de porumb conțin o activitate peroxidazică foarte intensă (tabela 3) în toată perioada cercetată și ea se menține la aproximativ același nivel.

Tabela 3

Activitatea peroxidazică a extractelor și a sucurilor vacuolare din frunze de porumb

Frunze	Zile de la semănare	Raport de extracție ml/g	Diluția %	ml în reacție	Număr de secunde necesare oxidării substratului la 37°C
Extract	11	0,4/1	4,25	1	150
	13	”	4	1	139
	15	”	4	1	160
	18	”	4,25	1	150
Suc	11	—	5,5	1	158
	13	—	5,8	1	150
	15	—	5,5	1	160
	18	—	5,3	1	155

O situație similară se constată în ceea ce privește activitatea peroxidazică a sucului vacuolar al frunzelor respective.

Din examinarea valorilor obținute în cazul extractelor și al sucurilor vacuolare se constată că peroxidaza este localizată atît în restul celulei, cît și în sucul vacuolar respectiv ; de remarcat, ca și în cazul plantulelor, o localizare a ei în special în restul celulei.

Frunzele etiolate prezintă o activitate peroxidazică mai scăzută decît cele normale (verzi). Parish [10] a observat același lucru la separarea electroforetică în gel de amidon a peroxidazei din coleoptile și din primele frunze de grîu, ajungînd la concluzia că sinteza ei este inhibată în primele frunze crescute la întuneric.

Separarea electroforetică a izoperoxidazelor. La electroforeza în gel de agar a extractului obținut din *axul embrionar* al seminței de porumb H.D. 336 negerminate se evidențiază șapte fracțiuni, dintre care trei cu activitate puternică, iar celelalte cu activitate foarte slabă.

Urmărind aspectul electroforetic al formelor moleculare ale peroxidazei din axul embrionar, după 2, 4, 6 şi 9 zile de germinare, se constată că în primele două zile de la germinare fracţiunile care în axul embrionar negerminat se evidenţiau foarte slab îşi intensifică activitatea. Începînd cu ziua a 6-a de germinare, se constată apariţia a două fracţiuni peroxidazice cu activitate slabă, care din punctul de vedere al sarcinii electrice globale sînt cele mai electronegative (fig. 1).

În a 7-a zi de germinare s-au analizat separat tulpiniţa şi rădăcinile. Se constată existenţa în ambele organe a aceloraşi fracţiuni cu activitate peroxidazică, unele din ele prezentînd însă intensităţi diferite.

Sucul vacuolar al plantulei recoltate după 7 zile de germinare prezintă acelaşi tablou al fracţiunilor peroxidazice ca şi extractul.

Extractul obţinut din *scutelul* seminţei negerminate evidenţiază şapte fracţiuni peroxidazice (două spre anod şi cinci spre catod), dintre care una cu o activitate foarte slabă. Germinarea are ca efect diverse schimbări în activitatea, mobilitatea electroforetică şi numărul fracţiunilor evidenţiate. Astfel, după 2 zile, în locul primelor două fracţiuni de la start spre catod ale scutelului seminţei negerminate, se evidenţiază o singură fracţiune, a cărei intensitate a coloraţiei este foarte puternică. După 4 zile, în aceeaşi zonă se separă din nou două fracţiuni. Tot în această perioadă se constată apariţia unei noi fracţiuni, puternic electronegative. În zilele următoare se pot evidenţia clar trei fracţiuni spre anod şi numai patru spre catod. Din cele prezentate putem deduce că în scutel peroxidaza are un rol important, pe care în primele 6 zile de germinare îl îndeplineşte sub diverse forme moleculare (fig. 2).

În extractul obţinut din *endospermul* seminţei negerminate se evidenţiază şapte fracţiuni peroxidazice, dintre care cinci cu activitate intensă şi două cu activitate foarte slabă. Germinarea are ca efect scăderea intensităţii, creşterea mobilităţii electroforetice şi mărirea la 3 a numărului fracţiunilor dinspre anod, iar la fracţiunile dinspre catod determină modificări cantitative (fig. 3). Rezultatul global al acestor modificări este însă o creştere continuă, lentă, a activităţii peroxidazei în perioada germinării (tabela 2).

Din datele prezentate în tabele se observă că activitatea peroxidazei creşte continuu în plantulă şi în scutel pînă în ziua a 6-a de germinare, iar în endosperm în toată perioada. Primul efect al germinării este intensificarea activităţii unor forme moleculare prezente şi în seminţele negerminate. Din ziua a 6-a de germinare (excepţie doar scutelul în a 4-a zi) se observă apariţia unor noi forme moleculare ale peroxidazei, puternic electronegative. Această comportare e diferită de cea a fosfatazei acide [11], la care schimbarea spectrului formelor moleculare o dată cu germinarea are loc în primele două zile, ulterior remarcîndu-se doar diminuări sau intensificări ale activităţii unor fracţiuni. În cazul enzimelor de tip α-amilazic [12] din porumb, se constată de asemenea modificarea formelor moleculare în primele 4—6 zile de la germinare, pentru ca ulterior aspectul enzimogramelor respective să rămînă neschimbat. Aceasta arată că în perioada cercetată cele trei enzime se comportă în conformitate cu necesităţile metabolismului organelor respective.

Peroxidaza din extractele *frunzelor* de porumb recoltate la 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare evidenţiază la electroforeza în gel de agar opt

fracţiuni (fig. 4) pentru toată perioada cercetată. Sucul vacuolar evidenţiază aceleaşi opt fracţiuni, diferenţa constînd în intensitatea diferită a activităţii unor fracţiuni din extract şi suc.

Comparînd enzimogramele obţinute cu plantula şi cu frunza, se constată o mare asemănare în aspectul lor pentru zona de la start spre anod, dar şi deosebiri, prin aceea că, de la start spre catod, plantula evidenţiază cinci, pe cînd frunza patru fracţiuni.

Era interesant de văzut dacă diferenţa dintre frunze şi plantulă este datorată apariţiei procesului de fotosinteză. De aceea, am urmărit separarea electroforetică a peroxidazei din extracte brute de frunze etiolate. Se constată că frunzele etiolate nu se deosebesc de cele verzi sub aspectul fracţiunilor peroxidazice evidenţiate şi deci dispariţia fracţiunii catodice, de altfel de intensitate slabă, este specifică apariţiei frunzei.

Ţinînd seama de prezenţa în gelul de agar a curentului de electroendosmoză, formele moleculare ale peroxidazei, evidenţiate de noi în lucrarea de faţă, sînt electronegative faţă de migrarea amidonului. O excepţie o constituie endospermul seminţei negerminate şi al celei germinate, care conţine sub formă de urme o fracţiune electropozitivă.

CONCLUZII

1. Activitatea peroxidazică a formaţiunilor seminţei negerminate este foarte slabă.

2. Germinarea determină o creştere a activităţii pînă în ziua a 6-a.

3. Rădăcinile conţin o activitate peroxidazică mai mare (aproximativ de 2,5 ori) decît tulpina.

4. Sucul vacuolar al plantulelor şi al frunzelor conţine peroxidaza în cantitate mai mică faţă de celelalte părţi ale celulelor acestora.

5. Frunzele etiolate au o activitate peroxidazică ceva mai scăzută decît a celor normale.

6. Peroxidaza din formaţiunile seminţei negerminate şi ale celei germinate, ca şi cea din frunze, se separă la electroforeza în gel de agar, în tampon acid boric-borax, pH 8,2, în 7—9 fracţiuni.

7. O dată cu germinarea au loc schimbări în spectrul formelor moleculare ale peroxidazei în primele 6 zile.

8. Extractele din plantule sau, separat, din tulpiniţă şi rădăcini, ca şi sucul vacuolar, conţin aceleaşi forme moleculare, a căror activitate poate avea însă intensităţi diferite.

9. Diferenţa dintre plantula după 6 zile de germinare şi primele frunze constă în dispariţia unei fracţiuni.

10. Frunzele etiolate prezintă acelaşi aspect electroforetic ca şi cele verzi.

Aduc mulţumiri pe această cale dr. Victoria Alexandrescu pentru sprijinul efectiv acordat la realizarea acestei lucrări.

Prezentată la redacţie
la 20 octombrie 1969

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

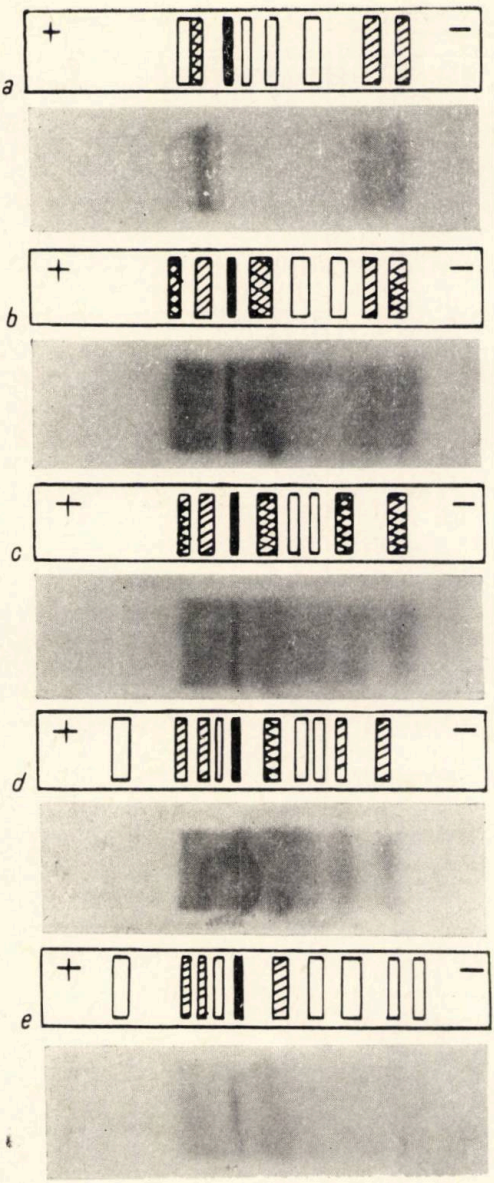


Fig. 1. — Enzimograma obținută în gel de agar în soluție tampon acid boric-borax, pH 8,2 pentru izoperoxidazele din axul embrionar al seminței de porumb:

a – negerminat; *b* – după 2 zile de germinare; *c* – după 4 zile de germinare; *d* – după 6 zile de germinare; *e* – după 9 zile de germinare.

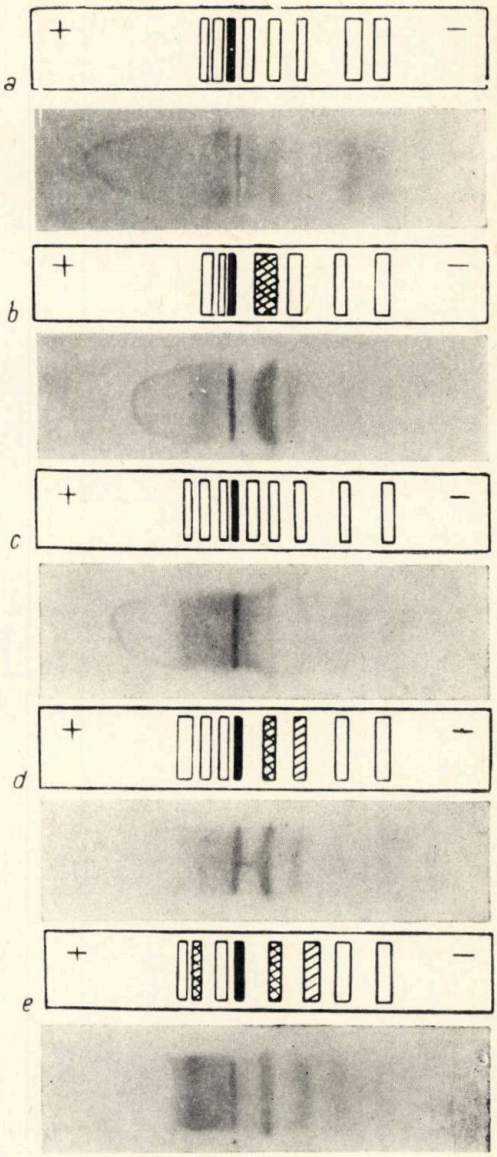


Fig. 2. — Enzimograma obținută în gel de agar în soluție tampon acid boric-borax, pH 8,2 pentru izoperoxidazele din scutelul seminței de porumb:

a — negerminat; *b* — după 2 zile de germinare; *c* — după 4 zile de germinare; *d* — după 6 zile de germinare; *e* — după 9 zile de germinare.

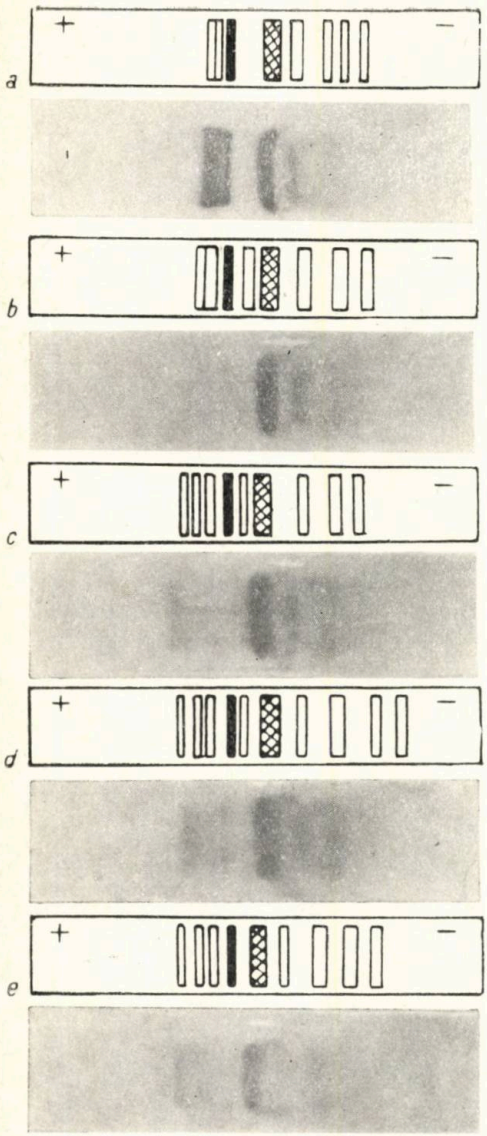


Fig. 3. — Enzimograma obţinută în gel de agar în soluţie tampon acid boric-borax, pH 8,2 pentru izoperoxidazele din endospermul seminţei de porumb: *a* — negerminat; *b* — după 2 zile de germinare; *c* — după 4 zile de germinare; *d* — după 6 zile de germinare; *e* — după 9 zile de germinare.

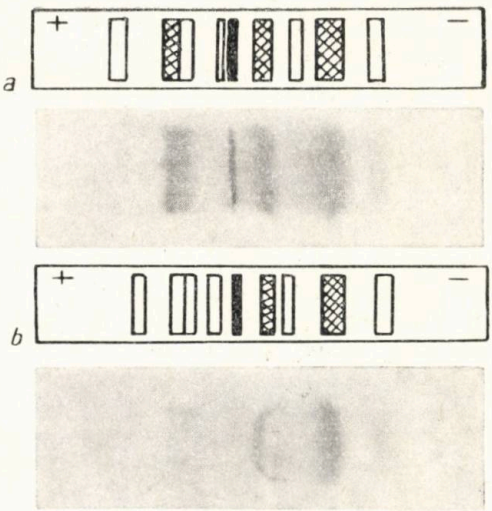


Fig. 4. — Enzimograma obţinută în gel de agar în soluţie tampon acid boric-borax, pH 8,2 pentru izoperoxidazele din extracte (*a*) şi din sucul vacuolar (*b*) de frunze de porumb la 15 zile de la semănare.

BIBLIOGRAFIE

1. D. C. Mc Cune, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94**, 723 (1961).
2. J. G. Scandalios, J. Hered., **55**, 281 (1964).
3. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum, Biochim., **5**, 97 (1968).
4. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, Rev. roum. Biochim., **5**, 189 (1968).
5. V. Alexandrescu, I. Călin, Rev. roum. Biochim., **6**, 171 (1969).
6. I. Brad, N. Hurduc, St. Niculescu, Z. Marcu, St. cerc. biochim., **11**, 117 (1968).
7. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969, p. 237.
8. I. Brad, Gh. Olteanu, Z. Marcu, St. cerc. biochim., **12**, *4* (1969).
9. A. N. Bojarkin, Biochimiia, **16**, 352 (1951).
10. R. W. Parish, Z. f. Pfl. Physiol., **60**, 90 (1969).
11. D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, *4* (1969).
12. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, St. cerc. biochim., **12**, *4* (1969).

PEROXIDASE IN MAIZE DURING THE FIRST DEVELOPING STAGES

SUMMARY

A picture of maize peroxidase in first 18 days from the beginning of germination is presented.

The peroxidase activity of ungerminated seed formations is very low. The germination brings about an increase of activity till the sixth day. The roots show a peroxidase activity 2.5 fold higher than the stem. Seedlings and leaves peroxidase is present mainly in the rest of the cell as compared to the vacuolar sap. In the first six days of germination, some changes in the enzyme molecular form pattern appear. The molecular forms of the leaf peroxidase are related to its appearance as an organ and not to the photosynthesis process.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 55–57, (1970)

SCHIMBAREA ŞI TRANSFORMAREA COLORANŢILOR DIN ALIMENTE

A. MOTAHARI şi A. KECHTKAR

Rezumat. — S-au studiat acţiunea factorilor oxidanţi, reducători, şi efectul temperaturii şi al conservării asupra structurii şi omogenităţii a trei coloranţi alimentari.

De cînd omul a descoperit focul şi l-a folosit pentru pregătirea hranei, el a încercat să dea culori variate şi aspect plăcut alimentelor care şi-au pierdut culoarea naturală prin coacere. Pentru aceasta el s-a servit de condimente şi de substanţe aromate, ca şofranul, curcuma etc. Schimbarea culorii nu are loc numai prin coacere, dar şi prin conservarea alimentelor în depozite. Astfel, fructele conservate capătă o culoare închisă, în timp ce margarina devine gri. Este evident că cumpărătorul nu acceptă astfel de produse şi nu poate fi convins de integritatea unor astfel de alimente. Din aceste motive se colorează caviarul în gri natural, cu scopul de a-l face mai apetisant. Din moment ce dorim să adăugăm aceste substanţe străine alimentelor, trebuie să fim siguri de inofensivitatea lor; de exemplu, ele nu trebuie să conţină substanţe cancerigene, ca α-naftilamina, toluidina, benzidina etc. Deoarece aceste substanţe colorante sînt scindate şi pierd dubla legătură de la azot reducîndu-se, este necesar ca fiecare produs de scindare să conţină o grupare sulfonică care să-l facă solubil în apă şi deci capabil de a fi eliminat din organism; astfel proprietatea cancerigenă scade. În acest fel putem elimina o parte din factorul nociv al coloranţilor [1].

Dar, pentru a fi siguri de inofensivitatea lor, este nevoie de alte criterii, ca experienţe de durată şi studii asupra efectului acestor produşi la animale. De aceea, observăm că pînă acum folosirea coloranţilor permişi depindea de experienţe pe animale şi de compoziţia acestor substanţe. Astăzi însă, cercetătorii studiază în special factorii oxidanţi, reducători, precum şi temperatura şi efectul conservării.

Hans Luck [2], membru al Institutului german de cercetare a produselor alimentare, a studiat modificarea chimică a coloranţilor sub acţiunea factorilor menţionaţi mai sus, precum şi produşii ce se formează după coacere şi conservare sau după reducere (cu sulfit de sodiu şi acid ascorbic sau mai bine cu produşi oxidanţi ca apa oxigenată).

Noi am continuat aceste cercetări în laboratorul nostru şi am studiat acţiunea factorilor oxidanţi, reducători şi efectul temperaturii şi al conservării asupra a trei coloranţi pe care H. Luck nu i-a menţionat în cercetările

sale : roşu nr. 1, albastru nr. 3 şi negru nr. 2. Trebuie să adăugăm că noi am studiat modificările acestor coloranţi sub influenţa factorilor menţionaţi, cu ajutorul cromatografiei în strat subţire şi al spectrofotometriei. Cercetările noastre au fost dirijate în trei direcţii :

1. S-a analizat prin cromatografie în strat subţire o soluţie de colorant 1/10 000 fiartă timp de 10 min, respectiv 30 min, sterilizată la 120° C şi tratată cu sulfit de sodiu, acid ascorbic şi apă oxigenată. Aceste manipulări s-au efectuat în 2 serii, în tampon de pH 7 şi de pH 3. Rezultatele obţinute ne-au arătat că fierberea şi sterilizarea la pH = 3 şi la pH = 7 nu au acţiune asupra coloranţilor, deoarece pe cromatogramă nu a apărut nici o pată suplimentară care să indice descompunerea colorantului. Dar cu sulfitul de sodiu, apa oxigenată şi acidul ascorbic s-au format pete suplimentare, vizibile atît la lumina zilei, cît şi în ultraviolet, sugerînd că au avut loc unele modificări ale colorantului.

2. În al doilea rînd, am studiat modificarea acestor coloranţi cu ajutorul spectrofotometriei. Dintre coloranţi am ales albastru nr. 3 şi negru nr. 2 şi i-am supus la diferite tratamente (fierbere, sterilizare la 120° C, acţiunea sulfitului de sodiu, a apei oxigenate, a acidului ascorbic) ; apoi am determinat spectrofotometric coeficientul de extincţie la diferite lungimi de undă (de la 350 la 800 nm). Coeficientul de extincţie (E) s-a reprezentat pe ordonată şi lungimea de undă pe abscisă ; astfel am obţinut curba modificării absorbţiei de energie luminoasă pentru cei doi coloranţi.

3. În sfîrşit, am studiat substanţa colorantă nr. 1 în prezenţa unui aliment, ca dulceaţa de gutuie. Pentru aceasta, am amestecat dulceaţa cu colorantul roşu nr. 1, am trecut amestecul în patru flacoane cu dop rodat şi am adăugat ca substanţă conservantă Na_2SO_3, acid benzoic şi acid formic, respectiv, păstrînd al patrulea flacon ca martor. Am ţinut cele patru flacoane la temperatura laboratorului (este de notat că al patrulea flacon a mucezit). După 4 zile, soluţia s-a filtrat printr-o ţesătură de lînă şi s-a supus cromatografiei în strat subţire. De data aceasta au apărut pe cromatogramă pete suplimentare, indicînd că substanţele colorante au suferit modificări. Totodată, cercetările noastre n-au mers mai departe şi nu am încercat să identificăm substanţele secundare.

Transformările pe care le-am menţionat pot fi discutate din două puncte de vedere : din punct de vedere tehnologic poate avea loc o distrugere a coloranţilor, ceea ce modifică aspectul produselor alimentare, dîndu-le un aspect dubios sau învechit ; pe de altă parte, poate avea loc o modificare secundară toxică în urma acţiunii substanţelor oxidante sau reducătoare asupra coloranţilor, aşa cum arată lucrările lui J. Eisenbrand şi colab. [3] — [6], care au redus coloranţi prin fermentaţie lactică şi au identificat unele amine primare foarte toxice.

Prezentată la redacţie
la 29 iulie 1969

Facultatea de farmacie,
Universitatea din Teheran

BIBLIOGRAFIE

1. R. Kanig, *Handbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag, Basel, 1965, p. 1134—1158.
2. H. Luck, *Mitteilung aus der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie*, München, 1964.

3. J. EISENBRAND, A. KLAUCK, D. PFEIL, Ztschr. f. Lebensmittel Untersuchung und Forschung, **106**, 56 (1957).
4. J. EISENBRAND, H. W. EICH, Ztschr. f. Lebensmittel Untersuchung und Forschung, **112**, 344 (1960).
5. J. EISENBRAND, A. KLAUCK, Ztschr. f. Lebensmittel Untersuchung und Forschung, **108**, 225 (1958).
6. J. EISENBRAND, H. W. EICH, Ztschr. f. Lebensmittel Untersuchung und Forschung, **114**, 240 (1961).

THE CHANGE OF FOOD DYES

SUMMARY

The action of oxidating and reductive factors was studied as well as the effect of temperature and storage upon the structure and the homogeneity of three food dyes.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 59–68 (1970)

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTELE SUPERIOARE
III. PIGMENȚII CAROTINOIDICI DIN VÎSC (*VISCUM ALBUM* L.)

G. NEAMȚU și C. BODEA

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotinoidici din frunzele, mugurii florali și florile de vîsc (*Viscum album L.*). Sub aspect cantitativ predomină carotinoidele cu structură α-iononică. Luteina, care este pigmentul principal, are importanță chemotaxonomică.

În timpul iernii, carotinoidele foliare se găsesc în cantitate mai mică decît în celelalte anotimpuri. Pigmenții carotinoidici din frunzeledə vîsc nu depind de planta — gazdă.

Vîscul este o plantă semiparazită, care își sintetizează o parte din substanțele organice prin fotosinteză, iar o parte le ia, împreună cu apa și substanțele minerale, de la planta-gazdă [1]. Pînă în prezent, speciile de vîsc au fost mai mult cercetate sub aspectul nutriției [2], [3], [4], [5] și al acțiunii pe care diferitele extracte o au asupra unor procese metabolice din organismele animale [6], [7].

Studiul semiparazitelor sub mai multe aspecte are o mare importanță, atît teoretică, deoarece aceste plante fac trecerea de la nutriția autotrofă la nutriția parazitară, cît și practică, prin faptul că pricinuiesc pagube plantelor de cultură.

Dintre plantele superioare semiparazite, vîscul are anumite caracteristici particulare, fapt ce ne-a determinat să începem cercetarea pigmenților carotinoidici la semiparazite cu această plantă. Vîscul are în tot timpul anului frunzele verzi și trăiește semiparazit numai pe plante lemnoase. Florile sale sînt slab dezvoltate și, de aceea, cercetarea carotinoidelor s-a făcut în cea mai mare parte la frunze.

În prezenta lucrare s-au urmărit cunoașterea influenței diferitelor plante-gazdă asupra naturii și cantității pigmenților carotinoidici din frunzele de vîsc, precum și raportul dintre carotinoidele foliare în decursul anotimpurilor.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru determinarea pigmenților carotinoidici din vîsc s-a folosit material proaspăt (frunze, muguri florali și flori), recoltat între anii 1966 și 1969 de pe plantele-gazdă salcîm (*Robinia pseudacacia*), plop (*Populus italica*), salcie (*Salix fragilis*) și jugastru (*Acer campestre*), din județul Cluj.

Extragerea pigmenților carotinoidici s-a făcut cu amestec de eter de petrol — acetonă — metanol 5 : 3 : 2.

Separarea carotinoidelor s-a făcut prin cromatografia pe coloană (30 × 3,5 cm), utilizîndu-se ca adsorbant zahăr praf pisat, puternic tasat. Developarea s-a făcut cu amestec de eter de petrol și benzen, pînă la 15%. Pentru cromatograme de amestec, cu pigmenți carotinoidici extrași din alte plante, s-a recurs la cromatografia în strat subțire, folosind ca adsorbant oxidul de magneziu, iar ca developant amestecul de eter de petrol — benzen — acetonă 6 : 3 : 1.

Identificarea și determinarea pigmenților carotinoidici s-au făcut prin aceleași metode ca și în lucrările anterioare [8], [9].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au determinat inițial pigmenții carotinoidici din frunzele de vîsc, recoltate în luna mai de pe salcîm, plop, salcie și jugastru, pentru a cunoaște în ce măsură diferitele plante-gazdă influențează carotinoidele din planta semiparazită. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul de carotinoide al frunzelor de vîsc (*Viscum album* L.) crescut semiparazitar pe diferite plante-gazdă (mg/100 g frunze proaspete, recoltate în luna mai)

Carotinoide	Planta-gazdă			
	salcîm (*Robinia pseudacacia*)	plop (*Populus italica*)	salcie (*Salix fragilis*)	jugastru (*Acer campestre*)
a) *Cu structură* α				
α-carotina	0,09	0,12	0,08	0,15
luteina	3,90	3,80	3,56	3,60
luteina ester	0,02	0,03	0,02	0,02
eloxantina	0,30	0,33	0,26	0,37
Total	4,31	4,28	3,92	4,14
b) *Cu structură* β				
β-carotina	2,42	2,32	2,18	2,23
criptoxantina	0,23	0,26	0,19	0,17
violaxantina	urme	—	—	urme
Total	2,65	2,58	2,37	2,40

În frunzele de vîsc se găsesc puține carotinoide cu structură β-ionono-nică. Sub aspect cantitativ predomină carotinoidele cu structură α-iononică. Prin faptul că se găsește în cantitate cu mult mai mare decît restul carotinoidelor, luteina este pigmentul principal și are semnificație chemotaxonomică.

Din determinările efectuate reiese că între pigmenții carotinoidici din frunzele de vîsc recoltate de pe diferite plante-gazdă nu există deosebiri calitative, ci numai cantitative, fără semnificație deosebită.

Pigmenții carotinoidici din frunzele plantelor-gazdă diferă în general de cei din frunzele de vîsc atît din punct de vedere calitativ, cît și cantitativ, după cum se vede din tabela 2.

Tabela 2

Conținutul de carotinoide din frunzele unor plante-gazdă ale viscului (mg/100 g frunze proaspete)

Carotinoidele	Planta gazdă			
	salcîm	plop	salcie	jugastru
a) *Cu structură* α				
luteina	2,10	1,87	1,89	1,95
eloxantina	0,15	0,10	urme	0,17
Total	2,25	1,97	1,89	2,12
b) *Cu structură* β				
β-carotina	1,38	1,42	1,28	1,27
criptoxantina	—	0,14	0,10	urme
violaxantina	0,35	0,34	0,27	0,34
neoxantina	0,20	0,20	0,25	0,22
Total	1,93	2,10	1,90	1,83

Din aceste determinări reiese că frunzele de vîsc au o carotenogeneză mai bogată decît frunzele plantelor-gazdă.

Întrucît nu există deosebiri esențiale între pigmenții carotinoidici din frunzele de vîsc recoltate de pe diferitele plante-gazdă, s-au cercetat în continuare carotinoidele din frunzele de vîsc semiparazitar pe salcîm și plop, în lunile august, noiembrie și februarie, cu scopul de a urmări raportul dintre carotinoide în decursul anotimpurilor. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 3.

Tabela 3

Conținutul de carotinoide al frunzelor de vîsc semiparazitar pe salcîm și plop, recoltate în diferite anotimpuri (mg/100 g frunze proaspete)

Carotinoide	Luna de recoltare și planta-gazdă					
	august		noiembrie		februarie	
	salcîm	plop	salcîm	plop	salcîm	plop
a) *Cu structură* α						
α-carotina	0,21	0,18	urme	urme	—	—
luteina	3,45	3,36	3,38	3,32	3,27	3,19
luteina ester	0,06	0,05	0,17	0,12	0,33	0,28
eloxantina	0,36	0,40	0,45	0,49	0,53	0,56
b) *Cu structură* β						
β-carotina	2,00	1,85	1,64	1,45	1,16	1,00
criptoxantina	0,18	0,21	0,13	0,15	0,09	0,11
violaxantina	urme	urme	0,16	0,19	0,25	0,27

Din aceste date reiese că o dată cu schimbarea factorilor de mediu se produc schimbări și în ceea ce privește natura și cantitatea pigmenților carotinoidici. Concomitent cu scăderea temperaturii se micșorează conținutul de carotinoide hidrocarburice și de xantofile din frunze, însă crește întrucîtva cel de xantofile esterificate și de epoxizi (eloxantina, violaxantina). În timpul iernii, conținutul total de pigmenți carotinoidici este în general mai mic decît în celelalte anotimpuri. Astfel, în frunzele de vîsc semiparazitar pe salcîm, în luna mai, s-au găsit 6,96 mg carotinoide/100g frunze, iar în luna februarie 5,63 mg carotinoide / 100 g frunze. Această scădere credem că poate fi corelată și cu procesul de fotosinteză, care este mult redus în timpul iernii, așa cum a constatat Sălăgeanu [5].

Raportul dintre carotinoidele oxigenate și cele hidrocarburice din frunzele de vîsc este mai mare iarna decît în celelalte anotimpuri. Creșterea violaxantinei are loc paralel cu micșorarea β-carotinei și a criptoxantinei, ceea ce sugerează posibilitatea formării violaxantinei prin oxidarea β-carotinei și a criptoxantinei. În mod asemănător, eloxantina se poate forma prin oxidarea α-carotinei și a luteinei.

Faptul că pigmenții carotinoidici sînt prezenți în frunzele de vîsc și în timpul iernii sugerează că biosinteza lor are loc în aceste frunze și că ei nu sînt luați de la planta-gazdă. Vîscul are deci, sub aspectul pigmenților carotinoidici, o independență față de planta-gazdă, un „metabolism carotinoidic propriu".

Pentru a putea urmări corelația dintre carotinoide la vîsc, s-au determinat pigmenții carotinoidici și din alte organe. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 4.

Tabela 4

Conținutul de carotinoide din mugurii florali și florile de vîsc semiparazitar pe salcîm și plop (mg/100 g material proaspăt)

Carotinoide	Muguri florali		Flori	
	salcîm	plop	salcîm	plop
a) *Cu structură* α				
luteina	3,20	2,85	3,75	3,60
eloxantina	0,95	1,00	1,20	1,16
b) *Cu structură* β				
β-carotina	1,06	1,10	0,90	0,85
criptoxantina	0,20	0,18	0,16	0,18
violaxantina	0,38	0,40	0,56	0,50

În mugurii florali și în flori, cu excepția α-carotinei și a luteinei ester, s-au identificat aceleași carotinoide ca și în frunze. Sub aspect cantitativ, eloxantina și violaxantina se găsesc în cantitate mai mare decît în frunze, iar β-carotina în cantitate mai mică.

Fructele verzi conțin aceleași carotinoide ca și mugurii florali, dar în cantitate mai mică. Fructele coapte sînt albe și nu conțin carotinoide. Ele sînt bogate în glicozizi și alcaloizi [10].

CONCLUZII

Din cercetarea pigmenților carotinoidici la vîsc semiparazitar pe salcîm, plop, salcie și jugastru reiese că plantele-gazdă nu influențează natura carotinoidelor din planta semiparazită.

Între carotinoidele din frunzele de vîsc și carotinoidele din frunzele plantelor-gazdă există deosebiri atît calitative, cît și cantitative. În frunzele de vîsc predomină carotinoidele cu structură α-iononică. Importanță chemotaxonomică are luteina, care este și pigmentul principal.

Cantitatea pigmenților carotinoidici din frunzele de vîsc scade în timpul iernii.

Prezentată la redacție
la 1 iulie 1969

Catedra de biochimie, Institutul agronomic
„Dr. P. Groza," Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. E. Pop, N. Sălăgeanu, St. Péterfi. H. Chirilei, *Manual de fiziologia plantelor*, vol. 2, Edit. de stat didactică și pedagogică, București, 1960, p. 389.
2. W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. XI, Springer Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1959, p. 179.
3. W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. X, Springer Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1958, p. 186.
4. N. Sălăgeanu, D. Galan-Fabian, Fiziologhiia rastenii, **8**, 547 (1965).
5. N. Sălăgeanu, St. cerc. biol., seria Botanică, **8**, 499 (1966).
6. E. Pora, E. Pop, D. Roșca, A. Radu, Pharmazie, **12**, *8*, 528 (1957).
7. F. Vester, A. Seel, M. Stoll, I. M. Müller, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., **349**, 125 (1968).
8. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **11**, 39 (1968).
9. G. Neamțu, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **6**, 227 (1969).
10. W. Karrer, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart, 1958, p. 110.

CHEMOTAXONOMIC STUDIES ON HIGHER PLANTS. III. THE CAROTENOIDS OF *VISCUM ALBUM* L.

SUMMARY

The carotenoids of leaves, flower buds and flowers of *Viscum album* are determined. Carotenoids with α-iononic structure are predominant. Lutein, the principal pigment, presents chemotaxonomic significance.

During the winter the amount of carotenoids in leaves is lower than in the other seasons.

The carotenoids of *Viscum album* do not depend on the host plant.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 65–68 (1970)

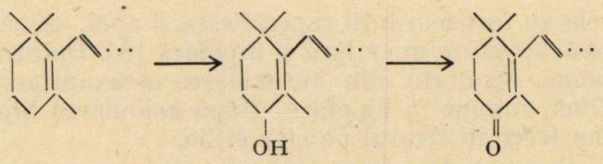
CAROTINOIDELE DIN *CARCINUS MEDITERRANEUS*

ELENA NICOARĂ, CORINA BILAUS, C. BODEA* şi I. PETRESCU**

Rezumat. — S-au studiat pigmenţii carotinoidici din diferitele organe ale crustaceului decapod *Carcinus mediterraneus*. Ca pigment principal s-a găsit astaxantina, care predomină în toate organele în afară de hepatopancreas, unde pigmentul principal este α-carotina. Ca pigmenţi secundari s-au mai găsit : luteina, cu o repartiţie relativ uniformă în toate organele, şi cantaxantina, care se găseşte în cantităţi relativ mai mari în pedunculii oculari.

Cercetarea structurii carotinoidelor şi a metabolismului carotinoidic din crustacei a constituit în ultimii ani obiectul mai multor publicaţii. Mai mult studiaţi au fost pigmenţii din *Artemia salina* (*Crustacea brachiopoda*) [1], [2], [3] şi din diferite specii de *Daphnia* (*Crustacea cladocera*) [4], [5], al căror pigment principal s-a dovedit a fi cantaxantina (4,4′-diceto-β-carotina) sau astaxantina (3,3′-dihidroxi-4,4′-diceto-β-carotina), în funcţie de pigmenţii din hrană. Se pare că în general branhiopodele, spre deosebire de alţi crustacei mai evoluaţi, nu au posibilitatea de a transforma oxidativ β-carotina decît pînă la cantaxantină. Dacă hrana lor constă din alge ce conţin astaxantină, cum sînt de exemplu, *Ankistrodesmus braunii*, *Chlorella pyrenoidosa* şi altele, atunci pigmentul depozitat în *Artemia salina* poate fi şi astaxantina.

Au fost cercetate, de asemenea, şi carotinoidele din cîteva specii de copepode [7], [8] şi decapode [9]; în toate cazurile, pigmentul principal găsit a fost astaxantina. Ca pigmenţi secundari au fost identificaţi : β-carotina, zeaxantina şi luteina, precum şi urme de 4-hidroxi-carotinoide (izoxantofile), considerate ca intermediari în oxidarea β-carotinei la cantaxantină, conform schemei :



β-carotină izoxantofile cantaxantină

* Pentru partea chimică.

** Pentru partea biologică.

Pigmenţii carotinoidici preluaţi de către crustacei din hrană sînt parţial metabolizaţi şi depozitaţi în hepatopancreas, ovare, ouă, epidermă şi ochi. Mici cantităţi se află desigur şi în sînge.

Astaxantina se găseşte în epidermă şi ouă, legată de componenţii proteici, formînd complecşi cromoproteici de diferite culori. În aceşti complecşi, pigmentul carotinoidic poate fi legat de o proteină simplă, ca în cazul crustacianinei existente în carapacea homarului, de o lipoproteină, ca în cazul ovoverdinei din ouăle de homar, sau de o glicoproteidă, ca în cazul ovorubinei, substanţă ce se află în ouăle gastropodei *Pomaceea canaliculata*.

În cadrul unui studiu mai amplu asupra pigmenţilor carotinoidici din crustacei, ne-am propus să ne ocupăm de decapodul *Carcinus mediterraneus* sau crabul de iarbă, cel mai răspîndit crab din Marea Neagră. Pînă nu demult s-a cosiderat, în mod greşit, că acest crustaceu aparţine speciei *Carcinus maenas*, originar din apele Nordului [10]. Pigmenţii carotinoidici din *Carcinus maenas* au fost deja cercetaţi de către Lenel (1961) şi de către Gilchrist şi Lee [9]. Cercetarea pigmenţilor şi la specia *C. mediterraneus* ar putea aduce unele date biochimice care să contribuie la caracterizarea şi diferenţierea celor două specii de *Carcinus*.

MATERIAL ŞI METODE

Materialul luat în analiză ne-a fost furnizat de către Institutul de cercetări marine de la Agigea şi constă din 10 indivizi de sex masculin, recoltaţi la talian. Materialul a fost disecat în următoarele părţi : hepatopancreas, pedunculi oculari, apendici locomotori, iar ceea ce a rămas constituie resturile corporale. După disecare, materialul a fost păstrat în metanol.

Extracţia pigmenţilor din apendicii locomotori şi din resturile corporale s-a făcut cu un amestec de acetonă : eter de petrol (de trei ori, lăsînd să stea cîte 24 de ore), iar din hepatopancreas cu eter de petrol, prin mojarare pînă la epuizare.

Pigmenţii care au trecut în metanol în timpul păstrării au fost recuperaţi prin deplasare în amestec de eter etilic şi eter de petrol, apoi adăugaţi la extractul principal. În cazul pedunculilor oculari, întreaga cantitate de pigmenţi s-a extras în metanol.

Separarea şi identificarea pigmenţilor s-au făcut prin cromatografie în strat subţire, utilizîndu-se atît straturi subţiri de silicagel, cît şi de oxid de magneziu.

Extractele au fost mai întîi saponificate şi apoi, după adăugare de eter etilic şi apă, separate în epifază şi hipofază [8]. Datorită caracterului său acid, astacina, rezultată din autoxidarea astaxantinei eliberate prin hidroliză alcalină, rămîne în hipofază. După acidularea hipofazei cu acid acetic, astacina trece în stratul de eter etilic.

Pentru cromatografiere, o cotă parte din extractele eterice a fost evaporată la sec, reziduul reluat cu benzen şi aplicat pe stratul de silicagel, respectiv de oxid de magneziu, în spot în formă de bandă. Irigarea plăcilor de silicagel s-a făcut cu neofalină : acetonă (5 :1), iar a celor de oxid de magneziu cu acelaşi sistem de solvenţi, însă în proporţie de 3 :1.

Ordinea pigmenților pe cele două straturi subțiri e diferită, datorită caracterului acid al astacinei; în cazul stratului de oxid de magneziu ea rămîne la start, pe cînd pe silicagel are un Rf mai mare decît zeaxantina și luteina.

Identificarea pigmenților s-a făcut pe baza poziției lor pe placa cromatografică, a maximelor de absorbție, a repartiției între eter de petrol și metanol 95% ca și prin cocromatografiere cu pigmenți autentici (astacină, luteină, zeaxantină, naturale; cantaxantină și β-carotină, sintetice).

Dozarea pigmenților s-a făcut — după separarea unei cote părți de extract pe placă de SiO_2 și eluarea cantitativă cu alcool metilic sau amestec de neofalină și alcool metilic pentru β-carotină — prin măsurarea densității optice la spectrofotometru, la lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție. În calcul s-au utilizat pentru $E_{1\,cm}^{1\%}$ valorile: 1 860 în cazul astaxantinei, 2 160 la luteină și 2 560 la zeaxantină [11].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul în carotinoide al diferitelor organe este prezentat în tabela 1, unde pigmenții separați sînt redați în procente din totalul de pigmenți.

Tabela 1

Conținutul în carotinoide al diferitelor organe de *Carcinus mediterraneus* (procente din totalul de carotinoide)

Pigmentul	Pedunculi oculari	Apendici locomotori	Hepato-pancreas	Resturi corporale
β-Carotină	1	6	72	1,3
Cantaxantină	16,5	3	2	1
Luteină și alte xantofile	26	35	9	30,7
Astaxantină	56,5	56	17	67
Total pigmenți mg/10 indivizi	0,0401	2,56	0,127	1,3

Cantitatea cea mai mare de β-carotină a fost găsită în hepatopancreas (72% din totalul pigmenților), o cantitate apreciabilă în apendicii locomotori și urme în pedunculii oculari și în resturile corporale.

Cantaxantina constituie la *Carcinus mediterraneus* un pigment secundar, aflîndu-se în general în procente mici. În cantitate relativ mai mare (16,5% din totalul de pigmenți) se găsește în pedunculii oculari.

Luteina are o repartiție relativ mai uniformă, găsindu-se atît în pedunculii oculari, cît și în apendicii locomotori și în resturile corporale în proporție de 26—35%; în hepatopancreas însă ea se găsește sub 10%.

Astaxantina constituie pigmentul predominant în toate organele cercetate, în afară de hepatopancreas, unde se găsește în proporție de 17% din totalul de pigmenți.

Se poate constata, din datele obținute, că între *Carcinus mediterraneus* și specia înrudită *Carcinus maenas* nu există diferențe principiale în ceea ce privește conținutul în carotinoide.

Procentul mare de β-carotină din hepatopancreas, organul cel mai direct legat de tubul digestiv, face să presupunem, la crustaceul studiat, la fel ca și la specia înrudită *Carcinus maenas*, o capacitate de preluare selectivă a pigmenților din hrană. *Carcinus* fiind carnivor, hrana lui este alcătuită în mare parte din crustacei sau alte animale acvatice, în care se știe bine că nu predomină β-carotina.

La resturile corporale și apendicii locomotori, raportul între pigmenți este, în linii mari, asemănător, cu mențiunea că în apendicii locomotori se găsește un procent mai mare de β-carotină și cantaxantină. Ambele părți sînt bogate în astaxantină și luteină, pigmenți ce intră în structura caroteno-proteinelor.

Faptul că procentul de cantaxantină e cel mai ridicat în pedunculii oculari ne determină să ne punem întrebarea dacă nu cumva acest pigment are vreo relație cu simțul de orientare.

Prezentată la redacție
la 10 iulie 1969

Catedra de biochimie,
Institutul agronomic „Dr. P. Groza",
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. B. M. Gilchrist, J. Green, Proc. roy. Soc. London, Ser. B, **152**, 118 (1960).
2. N.I. Krinsky, Comp. Biochem. Physiol., **16**, 181 (1965).
3. B. H. Davies, W. J. Hsu, C. O. Chichester, Biochem. J., **94**, 26 (1965).
4. J. Green, Proc. roy. Soc. London, Ser. B, **147**, 392 (1957).
5. H. Thommen, H. Wackernagel, Naturwissenschaften, **51**, 87 (1964).
6. Franz-Christian Czygan, Z. Naturforsch., **21 b**, 801 (1966).
7. L. R. Fischer, K. Kon , S. J. Thompson, J. mar. biol. Ass. U.K., **44**, 685 (1964).
8. C. Bodea, E. Nicoară, Gh. Illyes, M. Șerban, St. cerc. biochim., **8**, *3*, 271 (1965).
9. B. M. Gilchrist, W. L. Lee, J. Zool., Lond., **151**, 171 (1967).
10. Mihai Băcescu, *Decapoda*, în *Fauna Republicii Socialiste România — Crustacea*, vol. IV, fasc. 9, 1967.
11. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, Londra, 1965, p. 489.

THE CAROTENOIDS FROM *CARCINUS MEDITERRANEUS*

SUMMARY

The carotenoid pigments in the different organs of the crustacean decapod *Carcinus mediterraneus* have been studied. As principal pigment astaxanthin has been found, which is predominant in all organs, except the hepatopancreas where the principal pigment is β-carotene. As minor pigments have been found : lutein, with a relative uniform distribution in all organs, and canthaxanthin, which was found in relatively greater amounts in the eyes.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 69–73, (1970)

PREPARAREA UNEI TUBERCULOPROTEINE MARCATE CU ^{131}I ŞI DOTATE CU O ÎNALTĂ SPECIFICITATE IMUNOLOGICĂ

EUG. PĂUNESCU, I. POPESCU şi ANETA ŞERBESCU

Rezumat. — Se descriu condiţiile tehnice de fixare a ^{131}I pe tuberculoproteine cu ajutorul cloraminei T. Procesul de iodurare după metoda descrisă permite obţinerea unor preparate cu activitate specifică satisfăcătoare (36 μCi/mg), fără alterarea proprietăţilor imunologice a produsului. Prin filtrarea fracţionată a preparatului pe gel de Sephadex se pot obţine fracţiuni cu activităţi specifice net superioare (250 μCi/mg).

În cercetările de patologie a tuberculozei, marcajul cu iod radioactiv s-a folosit cu precădere în cazul tuberculinei [2], [11], [12], [14], fiind rezultatul unui proces de substituţie, la nivelul tirozinei [4].

Marcarea cu iod radioactiv necesită asigurarea păstrării integrităţii moleculei proteinei în aşa fel, încît după marcare aceasta să nu manifeste nici o scădere a proprietăţilor sale biologice. În funcţie de tipul de proteină utilizat şi de caracterele fizico-chimice ale centrilor reactivi, unele metode de iodurare asigură o înaltă eficienţă a marcării, fără a altera reactivitatea biologică a proteinei respective. Astfel, în cazul insulinei, Samols şi Williams [10], folosind metoda McFarlane [7], obţin o activitate specifică de 300-600 μCi/μg, fără a denatura calităţile hormonale ale preparatului; utilizarea aceleiaşi metode de iodurare în cazul altor proteine nu a permis însă obţinerea de rezultate similare.

O metodă de iodurare suficient de eficace, care permite — în condiţii particulare — păstrarea caracterelor biologice ale proteinei marcate [1], este cea preconizată de Hunter şi Greenwood [3], [5]. Această metodă realizează iodurarea în prezenţa cloraminei T, care în soluţie apoasă liberează acid hipocloros, cu acţiune lent oxidantă, ce permite formarea de iod cationic.

Principiul acestei metode, cu modificările aduse de McConahey [6], l-am folosit pentru a obţine o tuberculoproteină marcată, utilizabilă în cercetările din domeniul imunologiei tuberculozei.

MATERIAL ŞI METODĂ

Tuberculoproteina. Am utilizat în paralel tuberculină brută (preparată la Institutul „Dr. I. Cantacuzino" - Bucureşti), tuberculină purificată (PPD = protein purified derivative, preparată la Institutul „Pasteur" —Bucureşti) şi o tuberculină somatică, preparată de noi după

tehnica următoare: corpii bacilari (tulpina H_{37} Rv de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*) din cultură de 8 săptămîni pe Sauton sînt spălaţi cu apă distilată şi supuşi unor delipidări succesive cu acetonă, la rece şi apoi la cald (45°C), cu metanol la cald (46°C), cu cloroform şi eter etilic; după uscare în vacuum, masa bacilară delipidată este extrasă prin mojarare cu nisip de cuarţ, în prezenţă de ser fiziologic uşor alcalinizat (0,1% NaOH); în final, tuberculoproteina este precipitată din supernatantul extractului apos cu ajutorul a 3 volume de acetonă. Preparatul obţinut — după purificare prin reluare în tampon borat pH 8,6, f.i.=0,05, filtrare, reprecipitare cu acetonă, spălare cu eter etilic şi uscare în vid — se prezintă ca o pulbere alb-gălbuie, solubilă în mediu alcalin, migrează electroforetic ca o singură componentă şi conţine 67,2% substanţă proteică, 21,1% substanţă reducătoare, 0,68% fosfor şi 2,8% acizi nucleici [8].

Metoda de radiomarcare. Sursa de ^{131}I provine de la I.F.A.-Bucureşti şi conţine între 10 şi 25 mCi/ml NaI în soluţie apoasă. Reactivii necesari: a) soluţie apoasă de tampon fosfat 0,15M, pH 7,6; b) soluţie de cloramină T p.a. (UCB-Bruxelles), 1mg/ml în tampon fosfat; c) soluţie de bisulfit de sodiu p.a. (Schering), 1,25mg/ml în tampon fosfat; d) soluţie de iodură de potasiu, 10 mg/ml în tampon fosfat. Reactivii se prepară extemporaneu.

Soluţia de tuberculoproteină, conţinînd 10 mg în 2 ml tampon fosfat 0,15M, pH 7,6, se introduce într-un balon Pyrex de 50 ml, aşezat într-un cristalizator cu gheaţă, plasat deasupra platinei unui agitator magnetic. După o agitare de 3-5min, se adaugă cantitatea din soluţia de Na ^{131}I echivalentă cu 2-2,5 mCi activitate specifică în momentul experimentării. Sub agitare continuă se adaugă 0,2 ml din soluţia de cloramină T, iar după 8-10min se opreşte reacţia agentului oxidant cu ajutorul a 0,1 ml din soluţia de bisulfit de sodiu. În final, pentru a facilita eliminarea iodului nefixat de proteină, se adaugă 0,2 ml din soluţia de iodură de potasiu.

Eliminarea iodului nefixat se poate face prin dializă contra unei soluţii de tampon fosfat 0,15M,pH 7,6, în flux continuu, timp de 12-18 ore [6], metodă indicată în cazul unor cantităţi foarte mici de preparat. Noi am preferat însă metoda mai eficientă de gel-filtrare printr-o coloană de 1 g Sephadex G-50, folosind tampon barbituric 0,07M, pH 8,6, atît pentru echilibrarea coloanei, cît şi pentru eluare. Înainte de folosirea coloanei, aceasta se „presaturează" prin introducerea de 2 ml tuberculoproteină cu 5 mg/ml, urmată de o spălare cu 20 ml tampon barbituric 0,07M, pH 8,6. „Presaturarea" astfel realizată asigură recuperarea unei proporţii de pînă la 80% din tuberculoproteina marcată supusă filtrării ulterioare.

În final, tuberculoproteina eluată este colectată în fracţiuni de cîte 2 ml, a căror activitate specifică este determinată pe precipitatul tricloracetic.

Determinarea activităţii specifice a preparatelor obţinute s-a realizat pe precipitatele tricloracetice (5%, conc. finală) ale acestora, spălate de cîte două ori cu acetonă şi eter şi uscate în vid. Pentru evitarea contaminării controlului, peste eşantioanele de lucru s-a adăugat, în final, 0,1 ml dintr-o soluţie N de $AgNO_3$. Măsurătorile au fost făcute cu un contor cu fereastră tip Geiger-Müller pentru radiaţia β, care permite însumarea radiaţiilor β şi γ emise de radioizotop.

Pentru echivalarea numărului de pulsuri pe minut (p/m) cu unitatea de activitate izotopică, am utilizat în paralel un standard cu activitate cunoscută, prelevat din sursa de $Na^{131}I$ şi diluat pînă la realizarea unui număr de p/m de acelaşi ordin de mărime cu p/m date de probele supuse testării. Autoabsorbţia, pentru 100 μg tuberculoproteină, a oscilat între 10 şi 13%.

Testarea calităţilor biologice ale produsului s-a efectuat : *a*) prin stabilirea concentraţiei minime care provoacă la cobaiul tuberculizat intradermoreacţii cu diametrul de 1 cm, comparativ cu acelaşi preparat nemarcat; *b*) prin determinarea capacităţii preparatului de a se fixa pe macrofage histioide sensibilizate, producînd „reţele de macrofage" [9].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Tehnica sus-menţionată de marcarea proteinelor cu ^{131}I permite obţinerea unor bune rezultate atît în cazul tuberculinei şi PPD-ului, cît şi în acela al tuberculoproteinei somatice.

În condiţiile iniţiale, de tatonare, ale metodei, activitatea specifică obţinută, raportată la 1 mg substanţă, a fost de ordinul a 36 μ Ci (media a 7 experienţe), cu valori variind între 5,6 şi 112 μ Ci/mg, fără ca proprietăţile biologice ale preparatelor să fie afectate.

Rezultatele obţinute de noi prin metoda aplicată sînt cel puţin la fel de bune ca cele raportate de alţi autori. Astfel, Turk [12], folosind tehnica McFarlane, obţine un preparat de PPD cu o activitate pînă la 15μ Ci/mg, iar prin utilizarea unor tehnici mai simple alţi autori [14], [2], [11] obţin tuberculine marcate a căror activitate specifică este încă mai redusă. Unanue şi Dixon [13], cu ajutorul tehnicii McConahey nemodificate, obţin γ-globulină bovină cu o activitate specifică între 2 şi 15 μ Ci/mg.

O activitate specifică superioară, cu păstrarea calităţilor imunologice ale preparatelor, se poate obţine cu condiţia respectării cu stricteţe a metodologiei de lucru. În acest sens, o importanţă specială are utilizarea unei surse proaspete de ^{131}I, la un interval de timp cît mai scurt de la scoaterea din reactor. Astfel, utilizarea comparativă a aceleiaşi surse de $Na^{131}I$ în prima zi şi la 8 zile de la livrare, arată o scădere de 3—4 ori a randamentului marcării atunci cînd se foloseşte soluţia de $Na^{131}I$ de 8 zile.

Cantitatea de cloramină T introdusă în sistemul de reacţie şi timpul de contact la 0°C al proteinei cu cloramina au o deosebită importanţă, deoarece concentraţiile mici (5—10 μg/ml) de cloramină T nu realizează un randament bun, iar concentraţiile mari (peste 100 μg/ml) au tendinţa de a provoca denaturări ale proteinei supuse iodurării. Acelaşi efect de alterare a proprietăţilor biologice ale proteinei îl exercită şi prelungirea timpului de reacţie sau realizarea reacţiei la temperaturi mai înalte de 5°C [6].

Pentru oprirea reacţiei (prin neutralizarea efectului oxidant al cloraminei T şi reducerea cationilor I^+ din sistemul de reacţie) se poate folosi, cu aceleaşi rezultate, fie bisulfitul, fie metabisulfitul de sodiu. Majoritatea autorilor [6], [3], [1] îl preferă pe acesta din urmă.

O atenţie specială trebuie acordată filtrării prin gel de Sephadex, care asigură eliminarea iodului defixat. Eluarea fracţionată a coloanei permite obţinerea unor cantităţi de tuberculoproteină marcată cu un înalt nivel de activitate specifică (fig. 1). După cum se observă din figura 1, prin filtrarea fracţionată pe Sephadex G-50 se poate obţine o cantitate de 2—4 ml soluţie de tuberculoproteină (fracţiunile 3 şi 4) care conţine

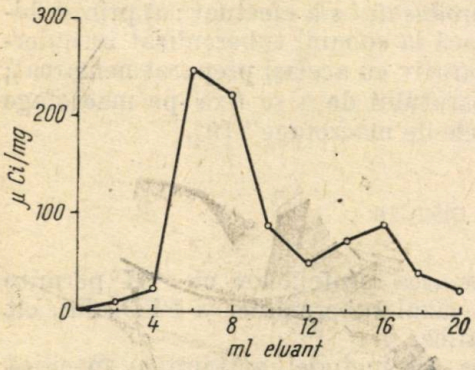


Fig. 1 — Activitatea specifică a fracţiunilor de ^{131}I-tuberculoproteină obţinute prin gel-filtrare în coloană de Sephadex G—50.

1,5 — 2,5 mg preparat, avînd o activitate specifică de peste 250 μCi/mg. O asemenea fracţionare diferenţiată, cu toate că reduce la aproximativ 1/5 randamentul metodei, permite totuşi obţinerea unor anumite cantităţi de tuberculoproteină cu o înaltă activitate specifică. Pentru acest motiv, în tehnica propusă, în vederea eliminării iodului nefixat, am preferat utilizarea gel-filtrării în locul dializei, aceasta din urmă nepermiţînd o selecţionare a fracţiunilor din preparat în funcţie de gradul lor de marcare.

În ceea ce priveşte conservarea calităţilor biologice ale produsului în cursul marcării, metoda de testare prin intradermoreacţie a arătat că acelaşi produs, înainte şi după radiomarcare, poate produce la cobaiul tuberculizat reacţii cu diametrul de 10 mm cînd este administrat în doze similare (125 u. OT). De asemenea, preparatele radiomarcate obţinute îşi păstrează calitatea de a se fixa specific pe macrofage peritoneale, sensibilizate în prealabil cu anticorpi citofili antituberculoproteină din serul animalelor hiperimunizate [9]. În figura 2 este prezentată o autoradiografie de culturi de macrofage hipersensibilizate, puse în contact cu ^{131}I-tuberculoproteină obţinută prin metoda descrisă; se observă fixarea granulelor radioactive pe suprafaţa macrofagelor şi formarea de punţi de legătură intercelulare prin intermediul tuberculoproteinei marcate.

CONCLUZIE

Tehnica cu cloramină T descrisă, avînd la bază metoda Hunter-Greenwood, modificată de McConahey, permite obţinerea unor tuberculoproteine marcate cu ^{131}I, dotate cu activitate specifică intensă. Prin marcare în condiţiile date, specificitatea imunologică a preparatelor nu este afectată.

Prezentată la redacţie
la 26 iunie 1969

*Sectorul de biochimie şi radioizotopi
al Institutului clinic de ftiziologie,
Bucureşti*

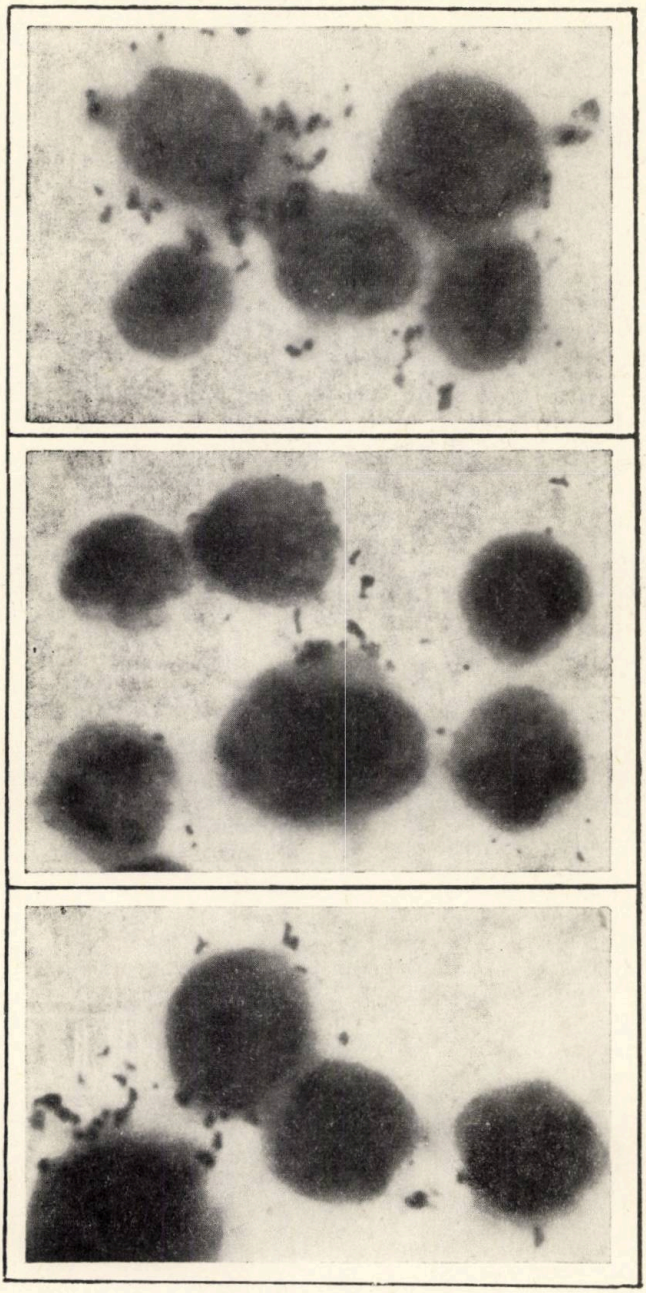


Fig. 2. — Autoradiografia unui frotiu de macrofage sensibilizate cu ser de la cobai tuberculizați și puse în contact cu tuberculoproteină marcată cu ^{131}I. Se observă fixarea granulelor radioactive pe suprafața macrofagelor și formarea de punți de legătură intracelulare prin intermediul ^{131}I-tuberculoproteinei.

BIBLIOGRAFIE

1. Bocci V., Nature (Lond.), **203**, 985 (1964).
2. Földes I., Tomcsányi A., în *Stoffwechsel und Stoffwechselprodukte von Mycobakterien*, Kolloquium Borstel, 21/22. Mai 1963, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1964, p. 213
3. Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S., Biochem. J., **89**, 114 (1963).
4. Hughes W. L., Ann. N. Y. Acad. Sci., **70**, 3 (1957).
5. Hunter W. M., Greenwood F. C., Nature (Lond.), **194**, 495 (1962).
6. McConahey P. J., Int. Arch. Allergy, **29**, 185 (1966).
7. McFarlane A. S., Nature (Lond.), **182**, 53 (1958).
8. Păunescu Eug., Mușăteanu R., Stoinescu M., Zaharescu C., St. cerc. biochim., **11**, 279 (1967).
9. Păunescu Eug., Popescu I., Rev. roum. Méd. Int,, **6**, 412 (1969).
10. Samols E., Williams H. S., Nature (Lond.), **190**, 1211 (1961).
11. Spiess H., Klin. Wschr., **39/40**, 1090 (1956).
12. Turk J. L., Int. Arch. Allergy, **17**, 338 (1960).
13. Unanue E.R., Dixon J. F., J. exp. Med., **121**, 697 (1965).
14. Yamamura Y., Maeda H., Matsumoto J., Yamamura Y., în *The use of radioactive isotopes in tuberculosis research*, Symposium Borstel, 1./2. Oktober 1965, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1967, p. 143.

PREPARATION OF A ^{131}I-LABELLED TUBERCULOPROTEINE WITH HIGH IMMUNOGENIC SPECIFICITY

SUMMARY

The paper describes the technical conditions for ^{131}I fastening on the tuberculoproteins in the presence of chloramine T.

By means of this method, the iodination process allows preparations with satisfactory specific activity (36 μ Ci/mg) to be obtained without damaging the immunologic properties of the product. By fractional gel-filtration of the preparation on Sephadex, certain fractions with clear higher specific activities (250 μ Ci/mg) can be obtained.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 75–78, (1970)

METODĂ EXPERIMENTALĂ PENTRU DETERMINAREA K_0 FOLOSIND ANTIGENE INSOLUBILIZATE (IMUNOSORBENȚI, CELULE)

M. PECEC

Rezumat. — Echilibrul de dializă se poate folosi doar cu haptene mici, ușor titrabile. Deoarece folosirea imunosorbenților este mai puțin pretențioasă, este interesant de căutat un model pentru determinarea K direct din experiențe, folosind imunosorbenți.

Se descrie o astfel de metodă, bazată pe determinarea concentrației de anticorpi legați la echilibru, ca o funcție a concentrației de anticorpi liberi.

Se discută eventualele erori ale metodei.

Echilibrul de dializă nu este o achiziție recentă în imunochimie. Tehnica descrisă prima dată de Marrack, în 1932 [1], a fost perfecționată de Karush, în 1949 [2], și a devenit calea cea mai directă pentru determinarea și studiul constantei intrinseci de asociere (K) a unei reacții antigen-anticorp.

Principiul metodei, derivat din legea acțiunii maselor, constă în interpretarea concentrației de complex, format la echilibru [(AbH)], ca o funcție a concentrației de haptenă liberă la echilibru — (H) — [3].

Metoda este aplicabilă doar la studiul haptenelor univalente, dializabile, pentru care există o metodă sensibilă de determinare cantitativă, de exemplu coloranți [3], [4], [8] sau substanțe radiomarcate [3], [8]. Or, cercetările experimentale din ultimii ani au adus în discuție necesitatea studierii afinității față de haptene mai mari (nedializabile) [4] sau față de antigene complexe, ca proteinele sau suprafața celulelor.

Scopul acestei comunicări este de a prezenta o metodă experimentală, similară echilibrului de dializă, care se poate aplica unor antigene sau haptene nedializabile, care au fost insolubilizate fie prin fixarea pe un suport inert (imunosorbenți) [5], fie în mod natural, ca antigenele eritrocitare [6], [7].

Pentru claritatea expunerii se va prezenta, pe scurt, una din cele mai folosite variante ale echilibrului de dializă, descrisă de Nisonoff și Pressman [8]. Admițînd că : a) situsurile aceleiași molecule nu se condiționează reciproc, b) toate situsurile au aceeași constantă de afinitate, K, c) haptena este univalentă, ecuația folosită în reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale este de forma

$$\frac{1}{(AbH)} = \frac{1}{K(H)\,(Ab_t)} + \frac{1}{(Ab_t)}, \qquad (1)$$

în care (AbH) şi (H) sînt concentraţiile de complex, respectiv de haptenă liberă la echilibru, iar (Ab_t) este concentraţia totală de situsuri combinative introduse în reacţie. Graficul ecuaţiei este o dreaptă care intersectează axa Oy în punctul $y = 1/(Ab_t)$, $x = 0$ şi a cărei pantă este $\Delta y/\Delta x = 1/K(Ab_t)$ (fig. 1). Pentru $y = 1/(AbH) = 2/(Ab_t)$, $x = 1/(H) = K$.

Dacă situsurile moleculelor de anticorp sînt eterogene în raport cu K, valoarea determinată din grafic este o valoare medie (K_0), iar punctele, obţinute experimental, nu se mai aşază pe o dreaptă, ci pe o linie uşor curbată spre axa Ox. Gradul de eterogenitate a fost măsurat combinîndu-se ecuaţia (1) cu o funcţie de distribuţie, iniţial descrisă de Sips [9] şi adaptată de Klotz [10] echilibrelor multiple ioni-proteine în mediu apos. Rezultatul este o ecuaţie de forma

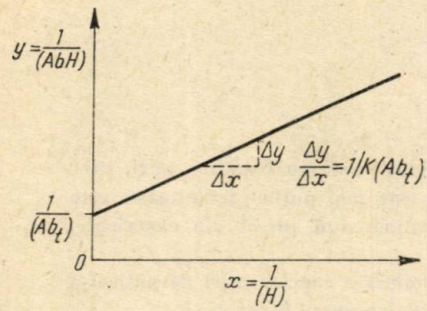


Fig. 1.— Reprezentarea grafică a ecuaţiei (1).

$$\frac{1}{(AbH)} = \frac{1}{[K_0(H)]^{\alpha}(Ab_t)} + \frac{1}{(Ab_t)}, \qquad 0 \leqslant \alpha \leqslant 1, \tag{2}$$

unde α este valoarea care, aplicată ecuaţiei (2), aduce punctele experimentale cel mai aproape de o linie dreaptă [3].

Condiţia experimentată, indispensabilă echilibrului de dializă — determinarea exactă a variaţiilor (H) la echilibru [8] —, nu poate fi respectată în cazul folosirii unui imunosorbent sau a unor celule [6], [7].

Se poate ajunge la o ecuaţie care nu include (H), plecînd de la aceleaşi condiţii ca în echilibrul de dializă, adică situsuri combinative independente şi omogene în raport cu K, dezvoltînd diferit expresia legii acţiunii maselor :

$$K = \frac{(AbH)}{(Ab)(H)} \tag{3}$$

sau

$$K(Ab)(H) = (AbH). \tag{4}$$

Înlocuind $(H) = (H_t) - (AbH)$, în care (H_t) este concentraţia totală de haptenă, sau grupări determinante, introdusă în reacţie, avem :

$$\begin{aligned} K(Ab)\,[(H_t) - (AbH)] &= (AbH), \\ K\,(Ab)\,(H_t) &= (AbH)\,[1 + K\,(Ab)]. \end{aligned} \tag{5}$$

Împărţind cu (H_t) $1 + K(Ab)$ şi luînd expresia reciprocă

$$\frac{(H_t)}{(AbH)} = \frac{1 + K(Ab)}{K\,(Ab)} \tag{6}$$

sau notînd $r' = (AbH)/(H_t)$, adică fracţiunea de haptenă legată la echilibru, obţinem :

$$\frac{1}{r'} = \frac{1}{K(Ab)} + 1. \tag{7}$$

În fine, ecuaţia (6) se mai poate scrie şi sub forma

$$\frac{1}{(AbH)} = \frac{1}{K(Ab)(H_t)} + \frac{1}{(H_t)}, \tag{8}$$

unde similitudinea cu ecuaţia (1) este evidentă. Graficul ecuaţiei (8), înscriind $1/(AbH)$ în funcţie de $1/(Ab)$ (fig. 2), este o dreaptă care intersectează axa Oy în punctul $y = 1/(H_t)$, $x = 0$ şi a cărei pantă este $\Delta y/\Delta x = 1/K(H_t)$. În punctul pentru care $y = 1/(AbH) = 2/(H_t)$, $x = 1/(Ab) = K$.

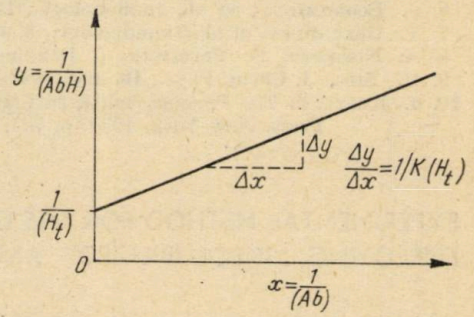


Fig. 2. — Reprezentarea grafică a ecuaţiei (8).

Experimental, modelul ar consta dintr-un set de probe cu concentraţii egale de haptenă (cantităţi egale de imunosorbent sau de celule), variindu-se cu fiecare probă concentraţia anticorpilor adăugaţi $[(Ab_i)]$. Se determină (AbH) şi (Ab) din concentraţiile anticorpilor legaţi şi, respectiv, liberi, la echilibru, cunoscînd valenţa moleculei. Dublete conţinînd ser normal (sau imunoglobuline normale) vor controla absorbţia nespecifică de proteină. Cînd modul de determinare al concentraţiei anticorpilor o permite, se poate adăuga direct în probe un exces de proteină normală.

Cu condiţia determinării prealabile a cantităţii de anticorpi din preparatul folosit (ser, fracţiuni serice), modelul nu pare să prezinte dificultăţi practice.

Se pot ridica însă obiecţii în ceea ce priveşte valoarea datelor obţinute în următoarele cazuri :

a) Dacă anticorpii folosiţi nu sînt omogeni în raport cu K. Deoarece nu există încă date experimentale obţinute cu această metodă, orice speculaţie ar fi hazardată.

b) Dacă modul de ataşare a antigenului pe matricea imunosorbentului este variabil sau grupările determinante sînt prea distante între ele [7], pot apărea impedimente sterice în reacţie, care vor modifica rezultatele [se subestimează (Ab)].

c) Dacă reacţia primului situs combinativ al moleculei de anticorp cu antigenul facilitează combinarea celuilalt situs [7], [10], valoarea K determinată experimental va fi inferioară constantei intrinseci de asociere.

Valoarea acestor obiecţii poate fi controlată doar prin studierea unui sistem anticorp-haptenă în mod paralel prin echilibru de dializă şi prin metoda propusă, folosind un imunosorbent. Studiul trebuie să includă atît determinarea afinităţii pentru molecula intactă, cît şi pentru fragmentele univalente.

Prezentată la redacţie la 4 august 1969

Catedra de biochimie I,
I.M.F., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. Marrack, F. Smith, Brit. J. exp. Path., **13**, 394 (1932).
2. H. N. Eisen, F. Karush, J. amer. chem. Soc., **71**, 763 (1949).
3. N. C. Pinckard, D. M. Weir, în *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1967. p. 513.
4. F. Karush, Advane. Immunol., **2**, 1 (1962).
5. V. Gheție, V. Micușan, *Analiza imunochimică*, Edit. medicală, București, 1966.
6. J. Economidou, et al., Immunology., **13**, 420 (1967).
7. T. Greenbury, et al., Immunology., **8**, 420 (1965).
8. A. Nisonoff, D. Pressman, J. Immunol., **80**, 417 (1958).
9. R. Sips, J. Chem. Phys., **16**, 490 (1948).
10. I. Klotz, în *The Proteins*, vol. I, part. B, sub red. H. Neurath și K. Bailey, Academic Press, New York, 1953, p. 727.

EXPERIMENTAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF K_0 IN EXPERIMENTS EMPLOYING "INSOLUBILIZED" ANTIGENS (IMMUNOADSORBENTS, CELLS)

SUMMARY

The method of equilibrium dialysis is restrained to small haptens, who are readily titratable.

As the use of an immunoadsorbent is less pretentious, search for a practical device to determine K from data obtained by the use of immunoadsorbents alone presents a special interest.

Such a method is described, based on the determination of bound antibody concentration at the equilibrium, as a function of the concentration of free antibodies.

The eventual errors of such a method are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 79–84, (1970)

IZOENZIMELE ŞI ACTIVITATEA LACTICODEHIDROGENAZEI DIN SERUL IEPURILOR INOCULAŢI CU DERMOVACCINĂ

M. ŞERBAN şi ELENA PRAHOVEANU

Rezumat. — În cazul infectării iepurilor cu virusul dermovaccinal s-au pus în evidenţă modificări ce afectează distribuţia activităţii enzimatice LDH între tipurile de izoenzime LDH_1 şi LDH_2.
Modificările semnalate comportă creşterea activităţii izoenzimei LDH_1 şi schimbarea raportului activităţii izoenzimelor LDH_1/LDH_2 după 24 de ore.
Aceste modificări sînt însoţite de creşterea activităţii LDH totale.

În cercetări anterioare s-a subliniat că schimbul metabolic şi energetic constituie baza proceselor vitale ale multiplicării intracelulare a virusurilor [1], [7], [12], [13].

Pătrunderea virusurilor în organism şi sinteza lor în anumite celule produc o serie de modificări biochimice, între care şi variaţii ale nivelului lacticodehidrogenazei (LDH) [8], [9]. Deşi o serie de date atestă creşterea activităţii acestei enzime în ţesuturile infectate cu diverse virusuri [6], [4], [10], [14], totuşi natura intervenţiei LDH în relaţia virus — celulă-gazdă, precum şi natura leziunii biochimice în care este implicată enzima şi al cărei efect este modificarea activităţii enzimatice rămîn încă neelucidate.

În acest context, pornind de la consideraţia că modelul izoenzimatic poate constitui un criteriu sensibil pentru punerea în evidenţă a unor eventuale modificări fine, ne-am propus investigarea izoenzimelor LDH în serul iepurilor inoculaţi cu dermovaccină, precum şi urmărirea modificărilor induse de acest virus ADN asupra activităţii totale a LDH.

Menţionăm faptul că cercetări care să pună în evidenţă schimbări produse de infecţiile virale asupra izoenzimelor LDH sînt foarte puţine şi se referă numai la observaţii efectuate cu virusul hepatitei şi virusul Rilley [3], [5].

MATERIAL ŞI METODE

Virusul utilizat a fost o tulpină de dermovaccină la pasajul II pe pielea scarificată de iepure, adaptată după pulpa vaccinală obţinută de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino". Experienţele s-au efectuat în trei repetiţii pe două loturi (*A* şi *B*) de iepuri (în greutate de aproximativ 2 000 g), fiecare lot cuprinzînd un număr de 4 animale. Lotul *A* a fost

inoculat cu dermovaccină (3×10^2ID diluţie 10^{-1}) pe pielea scarificată (fig.1). Lotul *B* a reprezentat animalele de referinţă, ţinute în aceleaşi condiţii, fără a primi însă virus (limfă vaccinală 3×10^2ID diluţie 10^{-1}, inactivată 30 min la 60°C) (fig. 2).

S-a lucrat pe un număr total de 24 de animale.

Iepurii ambelor loturi au fost sîngeraţi prin puncţie cardiacă la următoarele intervale de timp după inoculare : 12, 24, 48, 72 şi 96 de ore.

Serul obţinut după centrifugare la o turaţie de 2500 rot/min timp de 15 min la + 4°C, avînd o concentraţie proteică între 8,8 şi 9,0 g %, a fost utilizat pentru analiza electroforetică şi dozarea activităţii enzimatice.

Analiza electroforetică pentru punerea în evidenţă atît a proteinelor cît şi a izoenzimelor LDH s-a efectuat în gel de amidon, în sistem tampon discontinuu, după varianta Poulik [11]. Gelul a fost obţinut cu o soluţie 12,8 g % amidon în tampon tris-acid citric, pH 8,6. Cantitatea de proteină supusă fracţionării electroforetice a fost de 176 γ, în următoarele condiţii de migrare : tensiune 16 V/cm, intensitate 3mA/cm, durata 120 min, temperatura 8 ± 2°C. După secţionarea prealabilă a gelului, o jumătate a fost destinată pentru evidenţierea proteinelor cu o soluţie de Amido-schwarz, iar cealaltă jumătate pentru relevarea izoenzimelor. Aceasta s-a efectuat prin procedeul imersiei după tehnicile recomandate [17], [18] şi utilizate de către unul din noi în lucrări anterioare [7], [16]. Pentru efectuarea reacţiei enzimatice s-a folosit ca substrat lactatul de sodiu, ca derivat de tetrazolium TNBT, iar ca acceptori intermediari NAD şi fenazinmetosulfatul. Aprecierea cantitativă a rezultatelor s-a făcut prin prelucrarea datelor obţinute din curbele de integrare.

Activitatea enzimatică totală a LDH a fost determinată spectrofotometric, urmărindu-se viteza de formare a NADH, care prezintă un maxim de absorbţie la 340 mμ. Densitatea optică a probelor a fost determinată la intervale de timp de 30 s şi 3 min din momentul adăugării enzimei [13]. Activitatea enzimatică a fost exprimată în unităţi enzimatice[1] pe mililitru de ser.

Reactivi. S-a lucrat cu amidon hidrolizat BDH, tetranitrobluetetrazolium, fenazinmetosulfat, şi lactat de sodiu Serva, NAD Merck. Toţi ceilalţi reactivi au fost p.a.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute indică într-adevăr că, în funcţie de perioada de acţiune a virusului dermovaccinal asupra animalelor supuse infectării, se produc unele modificări la nivelul izoenzimelor LDH, ca răspuns al procesului patogen. Aceste schimbări se referă la distribuţia activităţii enzimatice şi nu afectează alte caracteristici ale celor cinci tipuri de izoenzime LDH serice.

După cum rezultă din figura 3, spectrul electroforetic şi repartiţia activităţii pe tipurile de izoenzime LDH din serul de iepure sînt în conformitate cu cele cunoscute. Activitatea este localizată cu precădere pe fracţiunile cu mobilitatea electroforetică cea mai mare (LDH_1, LDH_2)

[1] O unitate enzimatică reprezintă acea activitate enzimatică care produce o creştere a densităţii optice de 0,001/min/ml de ser.

și, într-o anumită măsură, pe forma parentală M (LDH_5), care în cazul serului de iepure se individualizează sub forma unei benzi difuze, cu mobilitate anodică foarte mică; activitatea formei hibride LDH_4 este, în general, destul de scăzută, reprezentînd circa 10% din valoarea totală. Ca o caracteristică importantă pentru raportarea modificărilor induse de acțiunea dermovaccinei, menționăm că în modelul izoenzimelor LDH din serul de iepure valoarea activității izoenzimelor LDH_1 și LDH_2 este aproximativ egal distribuită între ele, cu o ușoară deplasare în favoarea ultimei.

Din figura 4 rezultă că dermovaccina induce la nivelul modelului enzimatic LDH din serul de iepure anumite modificări care afectează în special distribuția activității enzimatice pe tipurile de izoenzime LDH_1 și LDH_2, cu mobilitatea electroforetică anodică cea mai mare. Conform rezultatelor noastre, aceste două izoenzime sînt cele mai labile la acțiunea virusului și, în consecință, ele prezintă o semnificație patologică de orientare în evoluția procesului viral.

În cadrul corelației dintre acțiunea virusului și particularitățile spectrului izoenzimatic, ca răspuns biochimic la această acțiune, s-au putut surprinde cîteva stadii. Astfel, în perioada cuprinsă de la inoculare și pînă la 12 ore nu se produc modificări marcante la nivelul izoenzimelor serice, modelul izoenzimatic rămînînd similar cu cel al animalelor de referință. După 12 ore de la inoculare, perioadă care corespunde cu inițierea și dezvoltarea procesului de multiplicare a virusului, se constată însă că repartiția activității între izoenzimele LDH_1 și LDH_2 este ușor afectată, în sensul că se produce o echilibrare a valorilor lor; în cazul animalelor de referință, așa cum s-a menționat, raportul dintre aceste două izoenzime este ușor deplasat în favoarea tipului LDH_2. Într-un stadiu ulterior, și anume începînd de la 24 de ore după inoculare, activitatea LDH_1 crește, încît raportul activității izoenzimelor LDH_1 și LDH_2 se inversează în comparație cu martorul, căpătînd astfel o valoare supraunitară. Finele perioadei de 24 de ore constituie, conform datelor noastre, o etapă care reflectă instalarea modificărilor biochimice, ca răspuns al influenței virusului asupra metabolismului celular normal.

Din tabela 1, unde sînt redate valorile procentuale medii, precum și raportul izoenzimelor LDH_1 și LDH_2 din serul de iepure normal și infectat

Tabela 1

Valorile procentuale și raportul tipurilor de izoenzime LDH_1 și LDH_2 din serul iepurilor normali și inoculați cu dermovaccină la diferite intervale de timp *

Normal / Inoculat	Tipuri de izoenzime LDH		LDH_1/LDH_2
	LDH_1	LDH_2	
Normal	20,5	25,5	0,80
Inoculat — 12 ore	23,0	23,5	0,98
Normal	17,5	22,5	0,77
Inoculat — 24 ore	34	25	1,36
Normal	23	28	0,82
Inoculat — 48 ore	38	29	1,31
Normal	28	34	0,82

* Rezultatele reprezintă media a 3 determinări.

cu virus, se observă sensul modificărilor menţionate la nivelul celor două tipuri de izoenzime. Raportul LDH_1/LDH_2 este subunitar la serul animalelor martor, capătă valori practic egale cu unitatea după 12 ore, pentru ca la 24 de ore să devină supraunitar. Este de menţionat că activitatea fracţiunii LDH_1 se menţine crescută pînă la 72 şi chiar 96 de ore (fig. 4).

Spre deosebire de modelul izoenzimatic LDH, spectrul electroforetic al proteinelor serice rămîne nealterat în decursul diferitelor etape analizate (fig. 3).

Considerînd că predominanţa formei parenterale $H(LDH_1)$, respectiv a tipurilor cu mobilitate electroforetică rapidă, reprezintă o caracteristică a ţesuturilor cu profil metabolic oxidativ, se poate presupune că creşterea izoenzimei LDH_1, constatată sub acţiunea virusului, şi-ar avea originea în lezarea cu predilecţie a unor celule aparţinînd unor astfel de ţesuturi.

Desigur, nu sînt excluse nici alte interpretări. Pe baza funcţiilor metabolice ale celor două tipuri parenterale de izoenzime H şi M, determinate genetic, se presupune că predominanţa formei H (LDH_1), care operează în prezenţa unor praguri scăzute de piruvat, nu permite conversia rapidă a acestuia în lactat şi, în consecinţă, se poate postula că în ţesuturile afectate de către virus procesele catabolice respective pot fi orientate spre calea aerobă, via ciclul Krebs. Faptul că activitatea LDH_1 creşte şi se menţine la nivel ridicat o anumită perioadă de timp ar reprezenta o adaptare a mecanismelor de control biosintetic, reflectînd posibilităţile de reglare a subunităţilor de bază.

În condiţiile noastre experimentale, creşterea activităţii izoenzimei LDH_1 nu poate fi atribuită elementelor figurate ale sîngelui, deoarece, pe de o parte, virusul investigat nu acţionează la nivelul acestor elemente, iar pe de alta modelul izoenzimatic LDH al eritrocitului şi leucocitului nu ar permite o asemenea interpretare, întrucît izoenzimele LDH_2 şi LDH_3 din acest model au activităţi mai mari decît LDH_1. De asemenea, afinitatea dermovaccinei, virus ADN, pentru sînge şi ţesuturile mezodermice este nulă sau aproape nulă.

Din punct de vedere biochimic, acţiunea dermovaccinei se manifestă şi asupra activităţii enzimatice totale LDH. Într-adevăr, în comparaţie cu animalele de referinţă, la cele inoculate se constată o creştere a acestei activităţi, care se menţine constant deasupra valorii normale pe tot parcursul perioadei investigate (0 — 96 ore). În raport cu animalele martor, creşterea activităţii LDH totale atinge valori pînă la 200%.

După cum reiese din figura 5, curba care reprezintă creşterea activităţii LDH prezintă două maxime, unul la 12 ore şi altul la 48 de ore de la inoculare; minimul constatat la 24 de ore după inoculare poate fi corelat cu modificarea sesizată la modelul izoenzimatic, modificare care implică inversarea raportului izoenzimelor LDH_1/LDH_2.

Deoarece dermovaccina este un virus cu multiplicare intracitoplasmică, sinteza completă a virusului fiind între 9 şi 12 ore, maximul de creştere a activităţii LDH totale, observat la 12 ore, poate fi, dacă nu atribuit, cel puţin corelat cu procesul multiplicării virusului. Este probabil ca creşterea de activitate semnalată să reprezinte fie ecoul unei stimulări a sintezei enzimei, în funcţie de necesităţile metabolice perturbate în ţesuturile în care virusul îşi poate exercita influenţa, fie ecoul eliberării ei în torentul circulator, ca o consecinţă a alterărilor produse de pătrunderea virusului

Fig. 1. — Leziune produsă pe pielea scarificată de iepure după inocularea cu virusul dermovaccinal.

Fig. 2. — Animal (martor) scarificat şi inoculat cu virusul dermavaccinal inactivat 30 min la 60°C.

Fig. 3. — *A* — modelul izoenzimelor LDH din serul de iepure neinoculat (martor); *B* — spectrul electroforetic al proteinelor din serul de iepure neinoculat (martor); *C* — spectrul electroforetic al proteinelor din serul de iepure la 48 de ore de la inoculare.

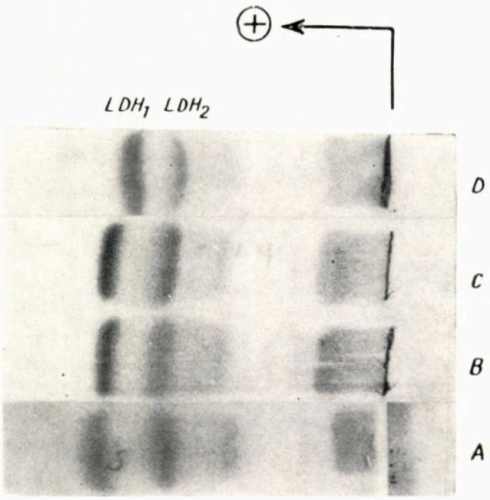


Fig. 4. — Modelul izoenzimelor LDH din serul de iepure la 12 ore (*A*), 24 de ore (*B*), 48 de ore (*C*), 72 de ore (*D*) de la inocularea cu dermovaccină.

Tabela 2

Activitatea enzimatică a LDH totale (unități/ml) din serul iepurilor inoculați cu virusul dermovaccinal *

Virus	Timpul după inoculare (ore)					
	0	12	24	48	72	96
(iepuri inoculați cu virus dermovaccinal) 3×10^2 ID diluția 10^{-1}	175±10,3	305±10,2	262,5± 14,3	422,5± 10,3	375±9,5	356±5,4
Martor (iepuri inoculați cu virus dermovaccinal inactivat) 30 min la 60° C 3×10^2 ID diluție 10^{-1}	177,5±8,5	187±10,2	158±9,8	162±4,7	159±4,2	163 ± 2,8
*t***	t = 0,19	t = 10,4	t = 6,5	t = 22,8	t = 27,3	t = 6

* Valorile reprezintă media a 4 determinări individuale.
** p nesemnificativ la 0 ore ($p > 0,01$).
p semnificativ de la 12 la 96 de ore ($p < 0,01$).

în celulă. Pentru această ultimă alternativă poate pleda și faptul că cel de-al doilea maxim al creșterii activității apare la 48 de ore, deci după sinteza virusului și producerea alterărilor la nivelul celular. Se observă că această creștere intervine cu aproximativ 48 de ore înainte de apariția pustulelor confluente.

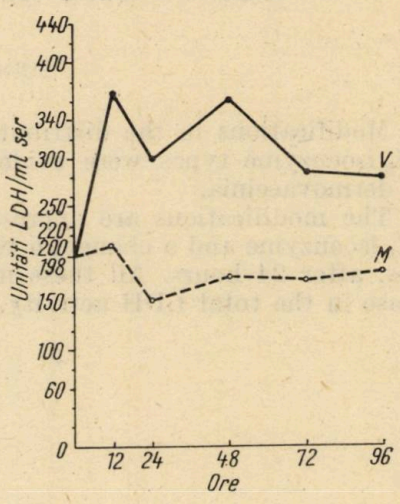


Fig. 5.— Curba reprezentînd activitatea enzimatică a LDH total din serul de iepure inoculat cu virusul dermovaccinal comparativ cu martorul.

CONCLUZII

1. Modelul izoenzimelor LDH și activitatea totală a acestei enzime se modifică sub acțiunea virusului dermovaccinal.

2. Modificările semnalate comportă creșterea activității izoenzimei LDH_1 și schimbarea raportului activității izoenzimelor LDH_1/LDH_2.

3. Activitatea totală a LDH crește semnificativ, curba prezentînd două maxime la 12 și 48 de ore de la inoculare.

Prezentată la redacție
la 10 septembrie 1969

Institutul de biochimie și Institutul de inframicrobiologie ale Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. Bauer D. J., Symp. Soc. gen. Microbiol., **2**, 46 (1953).
2. Birbeck J. A., Stewart A. G., Canad. J. Biochem. Physiol., **39**, 257, (1961).
3. Fossati M., Stepan J., Schön E., Hacher J., Vth. Febs., 944, 1968.
4. Hsieh K. M., Blumental H. T., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **91**, 626, (1956).
5. Johnson H. L., Kampschmidt R. F., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **120**, 557, (1965).
6. Kalter S. S., Eugster A. K., Albert P. J., Cohen D., Arch. ges. Virusforsch., **20**, 180 (1967).
7. Kovacs E., Experientia, **17**, 153 (1961).
8. Mahy B. W. J., Rowson K. E. K., Ann. Rep. Brit. Empire Cancer Camp., **41**, 224 (1963).
9. Mahy B. W. J., Rowson K. E. K., Salaman M. H., Virology, **23**, 528 (1964).
10. Martin C., Ph. d. Thesis Univ. of Paris.
11. Poulik M. D., Nature, **180**, 1477 (1957).
12. Prahoveanu Elena, Şerban M., St. cerc. inframicrobiol., **20**, *6* (sub tipar) (1969).
13. Prahoveanu Elena, Moisa I., St. cerc. inframicrobiol., **20**, *6* (sub tipar) (1969).
14. Rilley V., Lilbey F., Huerto E., Bardel D., Science, **132**, 545 (1960).
15. Şerban M., Rev. roum. Biochim., **4**, 211 (1967).
16. Şerban M., Cotariu D., Rev. roum. Biochim., **5**, 325 (1968).
17. Van Der Helm J. H., Lancet, **11**, 108 (1961).
18. Vessel E. S., Brody J. A., Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 544 (1964).

LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES AND ACTIVITY IN SERUM OF RABBITS INOCULATED WITH DERMOVACCINIA

SUMMARY

Modifications in the distribution of enzyme activity of LDH_1 and LDH_2 isoenzyme types were evidenced in serum of rabbits inoculated with dermovaccinia.

The modifications are expressed as an increase in the activity of LDH_1 isoenzyme and a change in the activity ratio of LDH_1/LDH_2 isoenzymes, after 24 hours. All these modifications are accompanied by the increase in the total LDH activity.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 1, 85–101, (1970)

REFERAT GENERAL

ANTIBIOTICELE DIN PLANTELE SUPERIOARE

MIRCEA V. IONESCU

Organismele vii conţin un mare număr de substanţe organice, între care unele sînt asemănătoare între ele ca structură chimică, altele sînt foarte diferite, dar înrudite după natura grupărilor chimice funcţionale ce conţin, după natura reacţiilor chimice pe care le pot da, după raporturile genetice în care se găsesc sau, în sfîrşit, după rolul lor fiziologic. Biochimia a grupat toate aceste substanţe în diferite familii. Cunoaştem astfel familia glucidelor, lipidelor şi protidelor. Gruparea substanţelor în una din aceste familii are la bază structura lor chimică asemănătoare. Ele formează aşa-numitele substanţe plastice, deoarece constituie elementele de construcţie anatomică a celulelor şi ţesuturilor oricărui organism vegetal, animal sau microorganisme.

Tot astfel cunoaştem familia vitaminelor, enzimelor, hormonilor şi pigmenţilor. Gruparea în aceeaşi familie a acestor substanţe, care pot fi foarte diferite ca structură chimică, este datorată faptului că toate manifestă o pronunţată activitate biochimică sau o activitate fiziologică, avînd rol de biocatalizator. Aceste familii formează împreună substanţele active ale organismelor. Deşi substanţele active au de cele mai multe ori o structură chimică foarte diferită, ele au în unele cazuri o componentă moleculară comună (cazul enzimelor mai ales) sau sînt capabile să determine aceleaşi procese fiziologice, datorită faptului că sînt înzestrate cu grupări atomice ce formează sisteme apte să reacţioneze în acelaşi sens (de exemplu un sistem oxido-reducător comparabil, ca în cazul unor vitamine sau pigmenţi).

În afara acestor substanţe plastice şi active, în organismul vegetal şi animal se întîlnesc numeroase alte substanţe organice, grupate şi ele în familii, datorită faptului că au o structură chimică asemănătoare, că manifestă o serie de caractere comune sau că sînt genetic înrudite. Acesta este cazul uleiurilor eterice, răşinilor, unor fenoli, unor chinone, acizilor vegetali, ligninelor, glicozizilor, taninilor, depsidelor, insecticidelor vegetale, aminelor, betainelor, alcaloizilor, amidelor, ureidelor etc. Toate aceste substanţe apar în organism în procesele de formare sau de degradare a substanţelor plastice şi sînt transformate mai departe sau rămîn mai ales ca atare, eliminîndu-se sau depunîndu-se la nivelul ţesuturilor, unde pot juca, în unele cazuri, un anumit rol; ele sînt produse intermediare sau finale de metabolism.

Între aceste produse intermediare sau finale de metabolism se găsesc în plantele superioare diferite substanţe care au proprietăţi bacteriostatice şi bactericide sau fungicide, proprietăţi insecticide şi proprietăţi toxice pentru diferite nevertebrate sau vertebrate, cum sînt rozătoarele, unele păsări etc. Ansamblul acestor proprietăţi caracterizează aceste substanţe ca *antibiotice*.

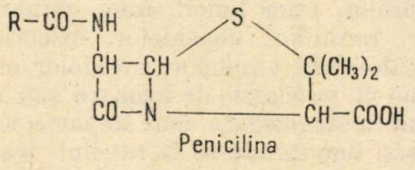
Noţiunea de antibiotic a fost folosită pînă acum pentru acele substanţe produse de microorganisme şi de plantele superioare, care au însuşiri bactericide sau fungicide, ea trebuie însă să fie extinsă, după părerea noastră, şi la substanţele naturale care au proprietăţi insecticide sau nematocide, helicide, acaricide, rodenticide etc. (proprietăţi pe care le numim zoocide în general); aceasta deoarece, după cum vom vedea, unele din aceste substanţe, în afară de însuşiri zoocide, au în acelaşi timp şi însuşiri fie bactericide, fie fungicide etc.

Se ştie de mai multă vreme că prezenţa unei anumite specii microbiene în mediul de cultură al altui microorganism poate inhiba dezvoltarea acestuia din urmă. Pasteur a fost primul care a arătat efectul antagonist al bacteriilor anaerobe asupra dezvoltării bacteriei antraxului, iar Victor Babeş este primul care atribuie această acţiune inhibitoare a unui organism de către altul unei substanţe chimice produse de acesta din urmă. Fleming a arătat încă din 1929 că, într-un mediu de cultură însămînţat cu *Staphilococcus aureus* şi contaminat cu o ciupercă, germenul devine transparent — este lizat — şi creşterea oprită; ciuperca aparţine speciei *Penicillium notatum*, iar mediul în care a fost cultivată ciuperca are proprietăţi bacteriolitice şi bactericide faţă de o serie de germeni gram-pozitivi (cum e stafilococul, streptococul, bacteria difterică). Fleming numeşte această substanţă activă penicilină şi, nefiind toxică pentru om şi animale, sugerează să fie aplicată pentru tratamentul bolilor infecţioase. Acesta a fost punctul de plecare al unei noi epoci în terapeutica bolilor infecţioase şi în descoperirea substanţelor antibiotice.

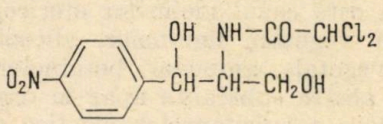
Folosită mai întîi în practica medicinii umane şi apoi a celei veterinare, începînd cu anul 1948, aplicarea antibioticelor este cercetată şi pentru protecţia plantelor.

Numărul antibioticelor bacteriene şi fungice descoperite este mare. Structura lor este diferită. Cele mai importante antibiotice formate în diferitele microorganisme în mediile lor de cultură sînt: *penicilina* (produsă de *Penicillium notatum*), *streptomicina* (*produsă* de *Actinomyces grisens*), *clormicetina* (sau cloramfenicolul, produs de *Streptomyces Venezuelae*), *gramicidina* şi *tirocidina* (produse de bacteria *Brevis*), *aerosporina* (produsă de *B. sporus*), *auromicina* (produsă de *Streptomyces aureofaciens*) etc. etc.

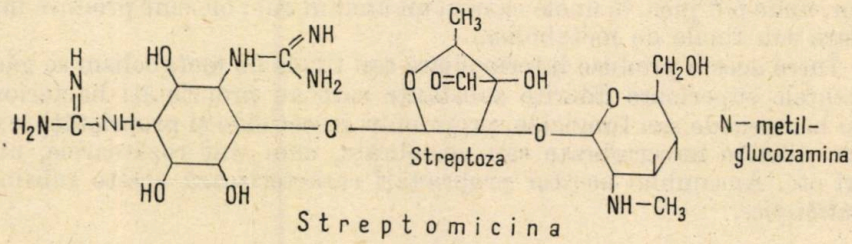
Stuctura chimică a acestor antibiotice ne arată că ele pot aparţine celor mai diferite tipuri de substanţe organice, ca, de exemplu:



Penicilina



Clormicetina



Streptoza

Streptomicina

Gramicidina, tirocidina, aerosporina sînt polipeptide; etc.

Antibioticele secretate de microorganisme în mediile lor de cultură nu fac parte din alcătuirea lor chimică; cantitatea pe care o produc depinde în cea mai mare măsură de condițiile create în aceste medii.

Antibioticele bacteriene și fungice experimentate pentru protecția plantelor sînt numeroase, peste 60 la număr [8]. Dintre ele, cele mai importante pentru protecția plantelor sînt: *streptomicina* (din *Sreptomyces griseus*); *blastimicidina* (din *Streptomyces griseochromogenes*); *actidiona*, un subprodus de la fabricarea streptomicinei, a cărei structură este de 3—2 (3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxietil-glutarionida; *griseofulvina* (din *Penicillium griseofulvum*), a cărei structură este 7-clor-4,6-dimetoxi-cumaran-3-onă-2-spiro-1 (2-metil-ciclohexan-2-onă-4); *terramicina* (oxi-tetraciclina, din *Streptomyces rimosus*); *trichotecina* (din ciuperca *Trichotecium roseum*) etc.

★

Antibiotice cu acțiune bacteriostatică și bactericidă sînt prezente și în plantele superioare; acțiunea lor este asemănătoare aceleia a antibioticelor produse de microorganisme, dar în general mai slabă decît a acestora din urmă.

Antibioticele din plantele superioare au fost numite *fitoncide*; denumirea este improprie după părerea noastră, deoarece sufixul „cid" este consacrat nu pentru originea unei substanțe, ci pentru acțiunea ei. Antibioticele produse de plantele superioare au acțiune bactericidă, fungicidă, insecticidă, rotencidă etc; ele nu pot fi numite deci fitoncide. Propunem din această cauză să fie numite antibiotice vegetale.

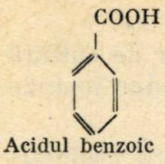
Unele antibiotice izolate din plantele superioare sînt folosite în terapeutica bolilor infecțioase la om (de exemplu chinina, care e un alcaloid); ele sînt folosite și în protecția plantelor, contra microorganismelor fitopatogene.

Substanțele antibiotice, obținute prin extracție din diferitele organe ale plantelor, manifestă activitate specifică față de unele microorganisme; multe din aceste extracte manifestă simultan și o activitate inhibitorie și una stimulatorie în creșterea microorganismelor [1].

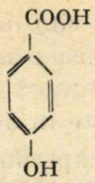
Se cunosc pînă în prezent peste 50 de substanțe antibiotice găsite în plantele superioare și în licheni (în afara alcaloizilor). Structura lor chimică este diferită. Specific acestor substanțe este caracterul lor nesaturat, mai ales aromatic și fenolic.

Mai importante și mai bine cunoscute sînt următoarele antibiotice găsite în plantele superioare și în licheni:

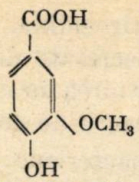
— *Acidul benzoic*, *acidul p-hidroxi-benzoic*, *acidul vanilic*, *acidul cafeic*, *acidul ferulic*, *acidul clorogenic* au fost identificați în morcovi și au proprietăți antibiotice.



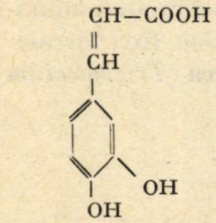
Acidul benzoic



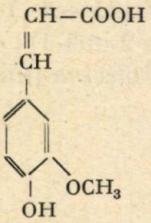
Acidul p-hidroxi-benzoic



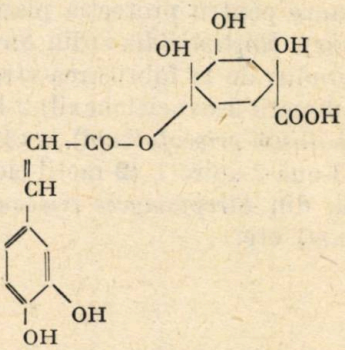
Acidul vanilic



Acidul cafeic



Acidul ferulic

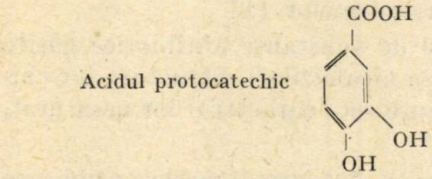


Acidul clorogenic

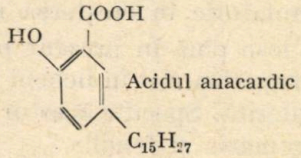
Acidul cafeic, acidul ferulic, acidul clorogenic, care manifestă proprietăţi bacteriostatice şi bactericide, pot inhiba şi formarea giberelinelor în plante [11]. Rezultă de aci că unele antibiotice pot manifesta nu numai o acţiune inhibitorie asupra microorganismelor, ci şi asupra unor hormoni ai plantelor superioare [9], [10]; ele apar astfel ca antihormoni, iar prezenţa lor în organismul vegetal, alături de unii hormoni, cum sînt giberelinele, ne arată că creşterea şi dezvoltarea plantelor, cel puţin în unele cazuri [10], este rezultatul antagonismului dintre unii fitohormoni şi unele antibiotice.

Observăm cu această ocazie că clorura de clorcolină, manifestînd o acţiune inhibitorie asemănătoare substanţelor citate mai sus [10], poate fi considerată ca un antibiotic de sinteză specific pentru formarea giberelinelor în plantele superioare.

—Acidul *protocatechic*, găsit în coaja de ceapă, are proprietăţi antibacteriene. Tot astfel acidul anacardic din *Anacardium occidentale* este bactericid.

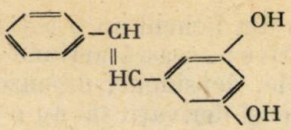


Acidul protocatechic



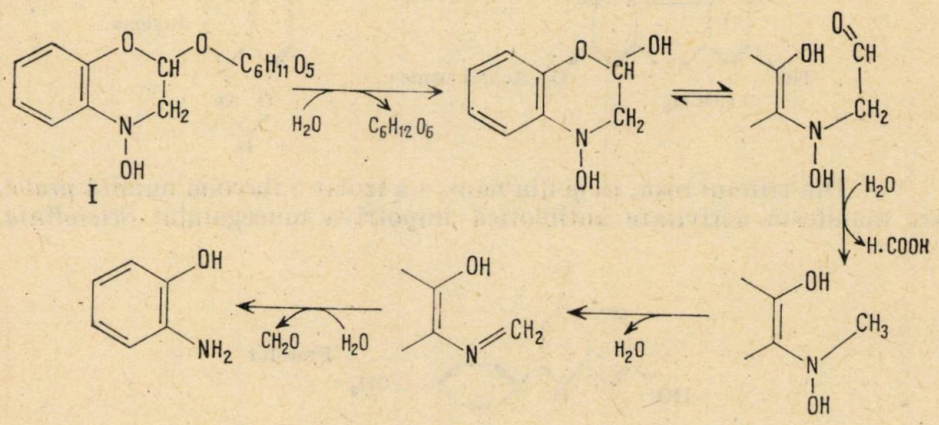
Acidul anacardic

— Numeroşi stilbeni, care sînt componenţi ai uleiurilor eterice, găsiţi în lemnul unor arbori, manifestă însuşiri de substanţe fungicide. Între aceştia, o acţiune antibiotică bactericidă şi fungicidă pronunţată manifestă *Pinosilvina*, care este un transstilben.

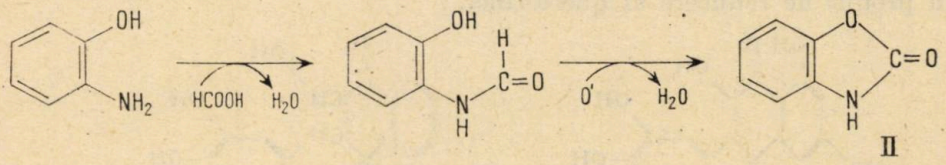


Pinosilvina

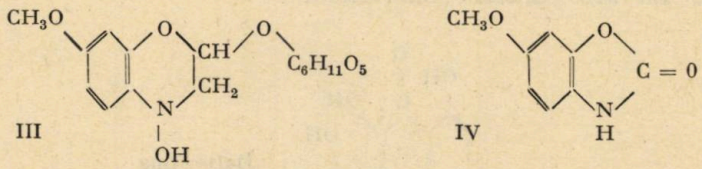
— În plantele de secară se găseşte un glicozid benzoxazinic (I), care în timpul zdrobirii plantulelor suferă mai întîi o hidroliză enzimatică spontană, după care agliconul este transformat în benzoxozolonă (II) şi acid formic, după un mecanism de reacţie, pe care-l formulăm în modul următor :



Ortoaminofenolul format este convertit ulterior de acidul formic într-un formil derivat, care oxidat dă naştere benzoxazolonei II ;



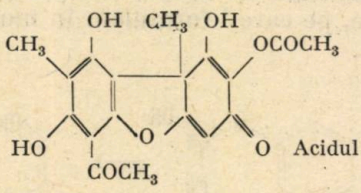
În plantulele de grîu şi de porumb se găseşte un alt glicozid benzoxazinic (III), care prin zdrobirea plantulelor suferă o transformare enzimatică asemănătoare, dînd naştere pînă la urmă la *6-metoxi-benzoxazolonă* (IV) :



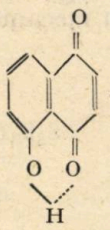
Benzoxazolona şi *metoxi-benzoxazolona* sînt substanţe care manifestă însuşiri antibiotice contra mucegaiului *Fusarium nivale*. Metoxi-benzoxazolona manifestă aceste însuşiri şi contra mucegaiului *Sclerotinia trifoliorum* şi are în acelaşi timp şi proprietăţi insecticide.

— Extractele obținute din licheni au o acțiune antibiotică mai ales față de bacteriile gram-pozitive; această acțiune este datorată unor acizi grași, precum și unor depside, depsidone, dibenzofurani și altele; dintre aceste substanțe, acidul *usnic* și derivații săi au o acțiune antibiotică ridicată, inhibînd chiar la diluții mari dezvoltarea unor microorganisme.

— Din nucile verzi (*Juglans*) s-a izolat *juglona*, care e un fenolnaftochinonic, cu însușiri bactericide și fungicide:

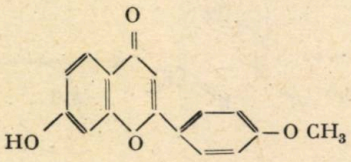


Acidul usnic



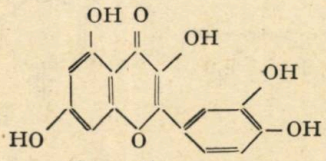
Juglona

— Din trifoiul roșu, ca și din năut, s-a izolat o flavonă numită *pratol*, care manifestă activitate antibiotică împotriva mucegaiului *Sclerotinia*.

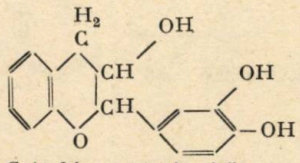


Pratolul

— Alături de acidul protocatechic, pe care l-am văzut mai sus, tot în ceapă, și anume în coaja ei, s-au găsit încă două substanțe cu proprietăți antibacteriene: *quercetina*, care este un flavonol, și *catechina*, care este un produs de reducere al quercetinei.

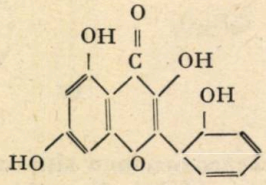


Quercetina



Catechina propriu-zisă

De asemenea, în frunzele și rădăcinile din *Datisca cannabina* se găsește o altă substanță de tip flavonic, *Datiscetina*, care apare sub formă de glicozid. Ea are caracter bactericid.



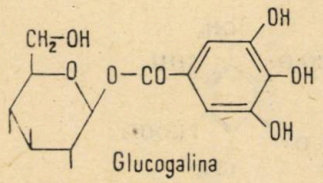
Datiscetina

— Cercetări recente par să arate că taninurile formează o familie de substanțe cu caracter fenolic, al căror rol este de protecție a plantelor

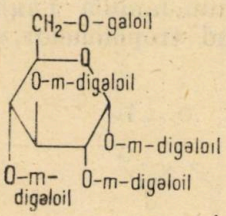
contra atacului dat de virusuri și microorganisme. În general fenolii, care se găsesc liberi sau ca glicozizi, mai ales în scoarța arborilor, în lemn și în frunze, joacă se pare un rol de rezistență a țesutului vegetal față de agenții patogeni [1].

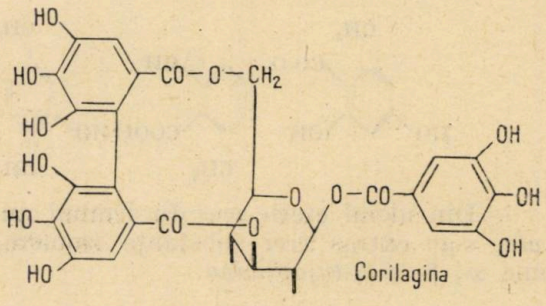
Taninurile formează două mari grupe:

1) Taninuri hidrolizabile care dau prin hidroliză, alături de zahăr, acid galic sau acizi poligalici (*galotaninuri*), respectiv acid elagic sau substanțe cu structură înrudită (*elagotaninuri*). Exemple de galotaninuri sînt *glucogalina* și esterul *mono-galo-tetrameta-galoil-galic* al *α-glucopiranozei*, care este componentul principal al taninului chinezesc; exemplu de elagotanin este *corilagina*.



Glucogalina





Corilagina

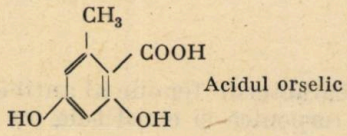
Esterul mono-galo-tetra-meta-galoil-galic al α-glucopiranozei

2) Taninuri nehidrolizabile, care sînt taninuri condensate sau taninuri *catechimice*. Acestea sînt derivați ai benzopiranului și derivă de la catechina propriu-zisă, văzută mai sus.

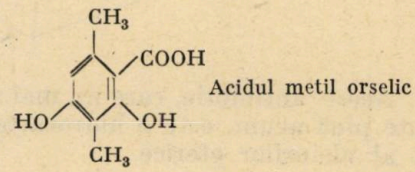
Taninurile se găsesc în cele mai multe plante, fiind universal răspîndite în regnul vegetal. Ele se găsesc, de la caz la caz, în coaja, lemnul, rădăcinile, frunzele și excrescențele plantelor, cum sînt gogoșile de ristic și nucile de Alep.

Taninurile se acumulează mai ales în țesuturile care nu mai formează sediul unei activități metabolice deosebite.

Unitățile structurale ale galotaninurilor sînt formate din acid galic sau acid digalic, care este un depsid. *Depsidele* ce se găsesc în regnul vegetal derivă de la acizii polihidroxibenzoici; în afară de plantele superioare, taninurile se găsesc și în licheni și în *Aspergillus*, unde sînt de două tipuri: *orselic* și *metilorselic*.

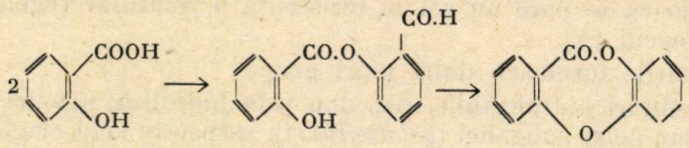


Acidul orselic



Acidul metil orselic

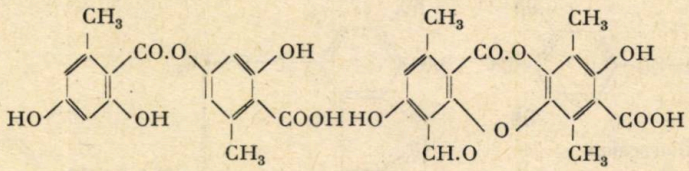
Cînd depsidele îşi unesc cele două nuclee fenolice printr-o punte eterică, formînd un nou ciclu intermediar, iau naştere *depsidonele*:



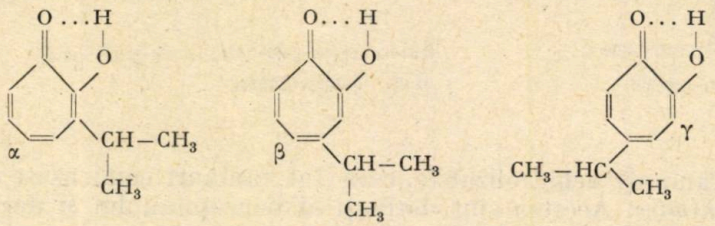
Acid fenol Depsid Depsidon

Prin hidroliză, depsidonele îşi desfac legătura depsidică şi trec în eteri difenilici.

Exemplu de depsid de tip orselic este acidul *lecanoric*; depsidon de tip metilorselic este acidul *virensic*, izolat din licheni şi din *Aspergillus*.



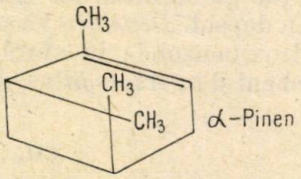
— Din uleiul eteric scos din lemnul unor arbori din familia *Thuja plicata*, s-au extras trei substanţe izomere, aparţinînd tropolonelor, şi anume α-, β- şi γ-*tujaplicina*.



Aceste substanţe manifestă o pronunţată activitate bacteriostatică, fungistatică şi insecticidă (mai ales formele β şi γ).

Tropolonele, substanţe foarte toxice, sînt componente ale uleiurilor eterice.

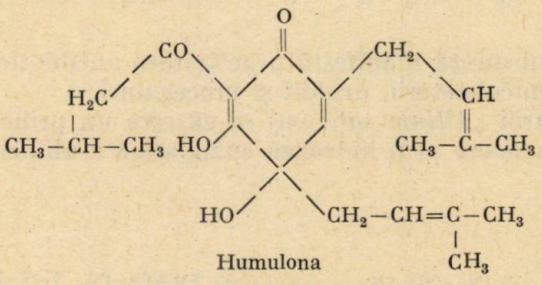
— Tot din morcovi a fost izolat, în afara fenolilor văzuţi mai sus şi α-*pinenul*, care manifestă proprietăţi antibiotice:



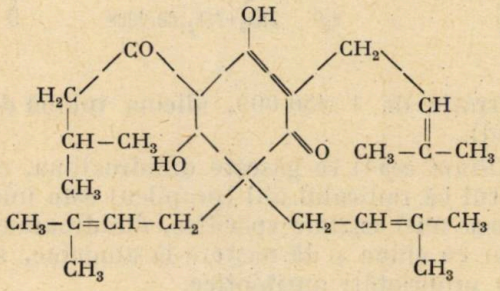
Acest antibiotic, care nu mai are caracterul fenolic al antibioticelor văzute pînă acum, este o hidrocarbură terpenică şi constituie un component al uleiurilor eterice.

Uleiurile eterice — sau mai exact unele din componentele lor — pot folosi, prin urmare, ca substanţe de apărare a plantelor.

Acesta este cazul şi a două antibiotice, *humulona* şi *lupulona*, care sînt diterpernoide din uleiurile eterice. Humulona se găseşte în răşinile de hamei (*Humulus lupulus*); ea are proprietăţi bactericide şi fungicide. Lupulona se găseşte în frunzele de *Aeonium lindleyi*; ea are proprietăţi bactericide.

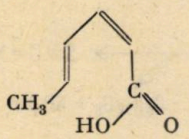


Humulona

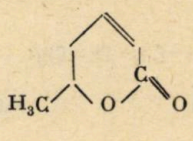


Lupulona

Tot astfel acidul *parasorbic*, care este o lactonă a acidului sorbic, este o componentă a uleiurilor eterice şi răşinilor obţinute din *Sorbus aucuparia*. El manifestă caractere bactericide şi protisticide.



Acidul sorbic

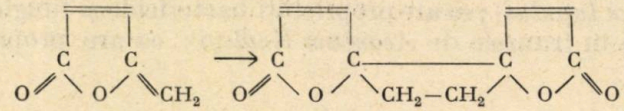


Acidul parasorbic

De asemenea se consideră azi că unele componente ale răşinilor, care sînt în legătură cu uleiurile eterice, au rol în vindecarea ţesuturilor lezate ale plantelor.

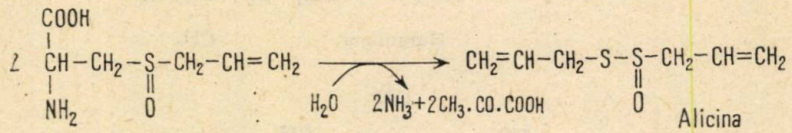
— *Uleiurile vegetale* manifestă şi ele o acţiune inhibitorie în dezvoltarea a numeroase microorganisme. Această activitate antibiotică a uleiurilor vegetale este datorată mai ales caracterului nesaturat al unor acizi graşi sau al produselor lor de autooxidare şi se manifestă mai ales faţă de bacteriile gram-pozitive.

— În *Anemone pulsatilla* (*pratensis*) și în diferite *Ranunculaceae* se găsește o substanță — protoanemonina — care prin ședere la aer se dimerizează și dă *anemonina* (un dispiran).



Această substanță manifestă o activitate antibiotică față de numeroase bacterii, micobacterii, drojdii și mucegaiuri.

— În usturoi (*Allium sativum*) se găsește un principiu activ — *alicina* —,care ia naștere prin hidroliza enzimatică a aliinei :

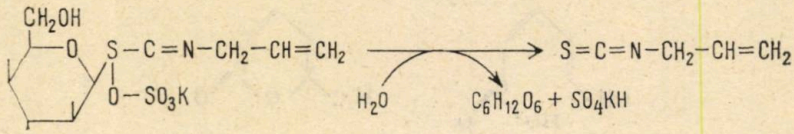


La o concentrație de 1 :250 000, alicina inhibă dezvoltarea multor bacterii (bactericid).

În ceapă (*Allium cepa*) se găsește dihidroaliina, care se deosebește de aliină prin faptul că radicalul alil (propilen) este înlocuit cu radicalul propil. Sub acțiunea unei enzime specifice, dihidroaliina este convertită în mod asemănător cu aliina și dă naștere la amoniac, acid piruvic și *tetrahidroalicină*, cu proprietăți antibiotice.

Toate soiurile de *Allium* conțin fitoncide.

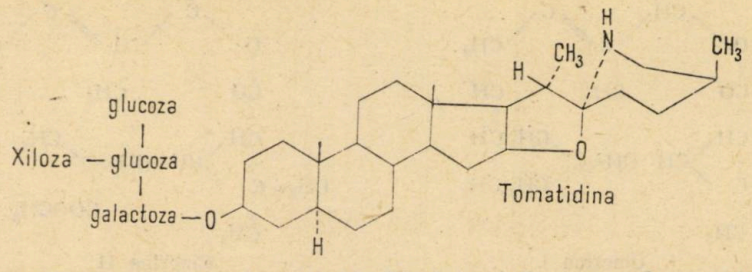
În semințele și în plantele de muștar, în hrean, în ridichi etc., se găsește, sub formă liberă sau sub formă de glicozid, *izosulfocianatul de alil* (alil-senevolul), care manifestă proprietăți antibiotice :



În crucifere, ca, de exemplu, în *Cheiranthus cheiri*, se găsește *cheirolina* (CH_3-SO_2-$(CH_2)_3$-NCS), care este o sulfonă cu însușiri bactericide și fungicide.

—Extractele apoase ale fructelor de tomate au proprietatea de a inhiba dezvoltarea multor bacterii, ca *Bacillus subtilis*, diferitele rase ale bacteriei *Salmonella* etc. Această însușire bacteriostatică este datorată faptului că fructele de tomate conțin mai multe substanțe antibiotice, și în primul rînd *tomatidina*, care inhibă dezvoltarea mucegaiului *Fusarium exisporum*. Tomatidina este o substanță de tip alcaloidic, care formează

agliconul glicozidului, numit *tomatina*:



Tomatina este și un insecticid, fiind toxică pentru larva gîndacului de cartof.

— Numeroase plante medicinale conțin substanțe cu însușiri antibiotice.

— Substanțe cu însușiri antibiotice ridicate, dar care nu au fost încă izolate, sînt semnalate în *Padus racemosa*.

— Nodozitățile leguminoaselor, tuberculele orhideelor, rădăcinile de *Aucuba Japonica* etc. secretă substanțe cu acțiune antibiotică, care inhibă dezvoltarea microflorei din sol.

—Fitoncidele, care sînt eliminate de frunzele diferitelor plante, își datoresc acțiunea antibacteriană mai ales aldehidelor.

— Din *Simaruba glauca* și din functele de *Perreira madagascariensis* s-a extras un principiu amar — glaucarubina —, avînd o puternică acțiune amibicidă.

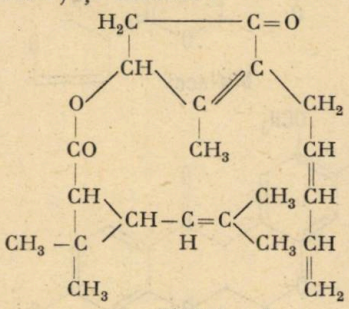
Alte antibiotice din plantele superioare, cu caracter bactericid, fungicid sau protisticid, care prezintă interes [8] sînt:

Acidul anacardinic ($C_{22}H_{32}O_3$) din *Anacardina occidentale*, care este bactericid față de bacterii, micobacterii, mucegaiuri și drojdii.

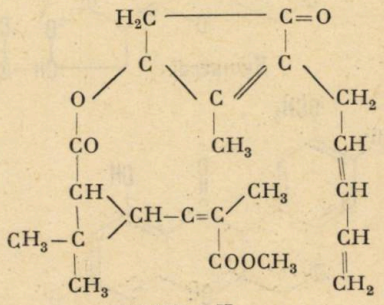
Acidul caseinic din *Cassia* (bactericid).

Lista antibioticelor bacteriostatice și bactericide ce se găsesc în plantele superioare este încă și mai mare; ea poate fi completată cu aceea a insecticidelor vegetale și a substanțelor a căror acțiune toxică se manifestă în numeroase cazuri asupra vertebratelor.

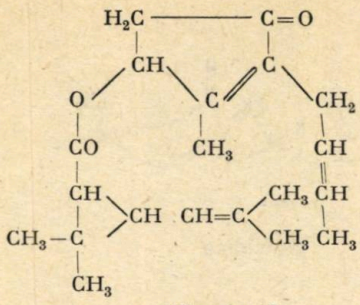
Substanțe organice de structură chimică foarte variată cu însușiri *insecticide* se găsesc în numeroase plante. Astfel în florile de *Chrysanthemum de Peonia albiflora*, *Pyrethrum cinerariaefolium*, *P. roseum* și *P. Carneun* s-a izolat un amestec de 4 substanțe, care fac parte din grupa *retinelor*, și anume:



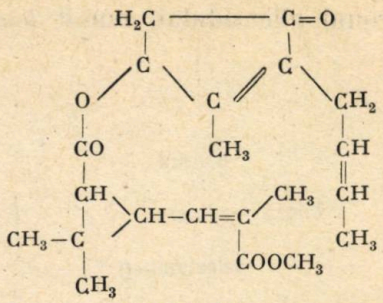
Piretrina I



Piretrina II



Cinerina I



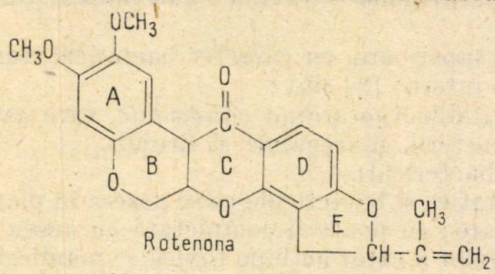
Cinerina II

Toate aceste retine sînt genetic înrudite, au caracter de esteri, care prin degradare hidrolitică dau naştere unui cetoalcool nesaturat (piretrolonă, respectiv cinerolonă) şi unui acid ciclopropan monocarboxilic, respectiv dicarboxilic.

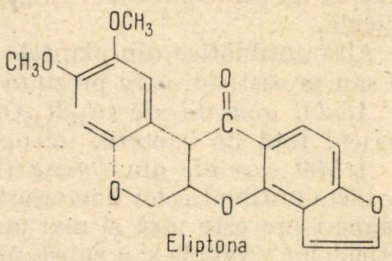
Toxicitatea acestor retine faţă de insecte este foarte mare; animalele cu sînge cald sînt însă mai puţin sensibile.

În unele leguminoase se găseşte o altă serie de insecticide avînd nucleul benzopiranic; ele formează grupa *rotenoidelor*. Cea mai importantă din aceste substanţe este *rotenona*, care se găseşte mai ales în frunzele, rădăcinile şi scoarţa genurilor *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia*, *Milletia* şi *Mundulea*.

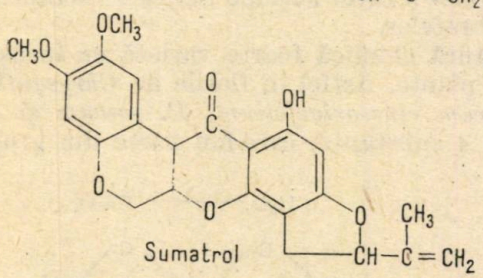
Rotenoidele au structura următoare:



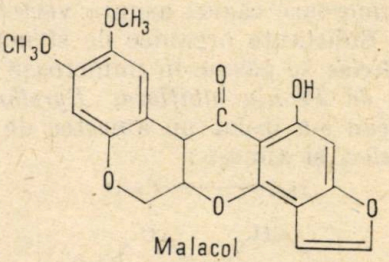
Rotenona



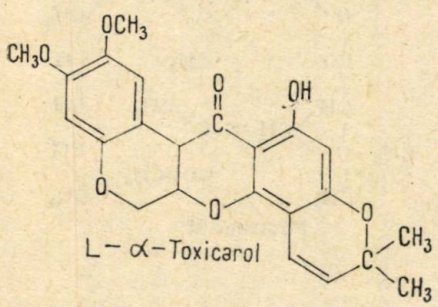
Eliptona



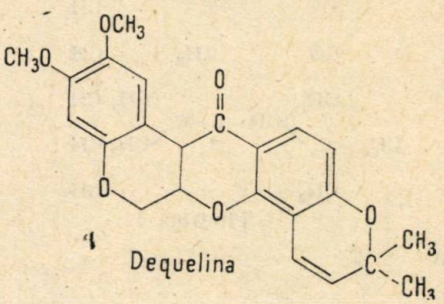
Sumatrol



Malacol



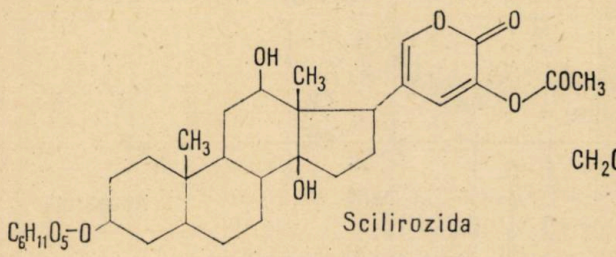
L – α – Toxicarol



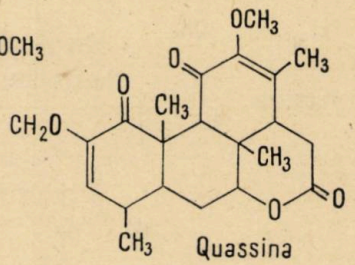
Dequelina

Rotenoidele sînt toxice pentru insecte şi animalele inferioare, mai puţin pentru om.

Toxică pentru rozătoare este şi ceapa roşie de mare (*Scilla maritima*) care creşte în regiunile mediteraneene. Principiul toxic este glicozidul *scilirozida*:



Scilirozida

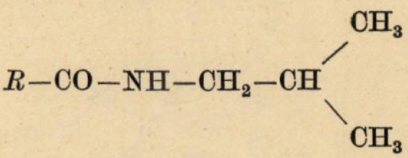


Quassina

Cu excepţia şobolanilor şi a şoarecilor, scilirozida nu este toxică pentru om şi animalele superioare.

În planta *Quassia amara* (*Simarubaceae*) se găseşte o substanţă amară, solidă, quassina, cu însuşiri insecticide ce se manifestă prin vaporii săi. După cum arată structura sa, este o lactonă.

În plantele din familiile *Compositae* şi *Rutaceae* este prezentă o altă serie de insecticide cu constituţia chimică a unor *izobutilamide nesaturate*, a căror formulă generală este:



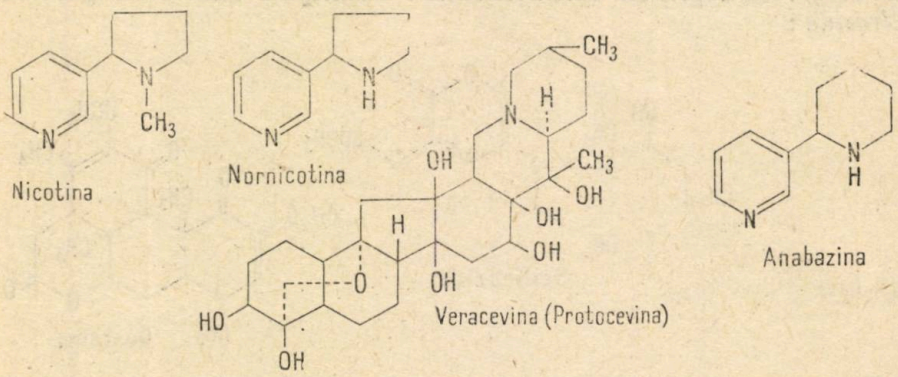
în care *R* este un radical nesaturat.

În sfecla albă a fost identificat *senevolul feniletilic*, avînd formula C_6H_5-CH_2-CH_2-N = C = S (izosulfocianatul feniletilic), a cărui toxicitate faţă de insectele sinantrope (muşte) este mai mare decît cea a preparatelor sintetice de aldrină sau clordan ($C_{10}H_8Cl_6$).

După cum am văzut mai sus, unele substanţe din grupa antibioticelor bacteriostatice şi bactericide manifestă şi proprietăţi insecticide; acesta este, de exemplu, cazul metoxi-benzoxazolonei (activă contra insectei *Pyrausta nubilalis*), al tujaplicinelor, al alcaloidului tomatidina etc. Trebuie considerate deci antibiotice şi substanţele bactericide şi cele insecticide.

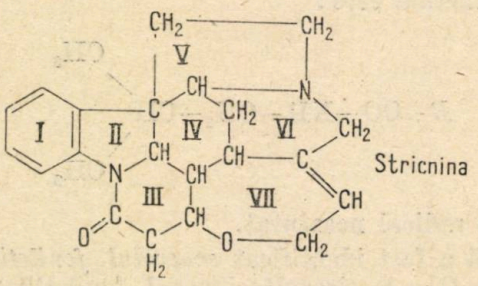
Nu numai tomatidina, ci şi alţi alcaloizi manifestă proprietăţi insecticide. Astfel în tutun (*Nicotiana tabacum* şi mai ales *N. rustica*) se găseşte *nicotina*, iar în anumite specii de *Nicotiana tabacum* şi *N. silivcatris*, în *Duboisia hopwoodi* se găseşte *nornicotina*. Aceşti alcaloizi sînt foarte toxici pentru insecte, precum şi pentru om şi animale cu sînge cald. Tot astfel în *Veratrum album*, în *Sobodila oficinalis* etc. se găseşte alt alcaloid, *veratrina*; în planta *Anabasis aphilla* se găseşte alcaloidul *anabasina*. În

Ryania speciosa se găsește *ryanodina*. În unele specii de *Ranunculaceae*, ca *Delphinium* (nemțișor), *Nigella* (negruscă), *Heleborus niger*, se găsește *helebórina*. Toate aceste substanțe au însușiri insecticide remarcabile.



Veratrina (cevadina), cu formula $C_{32}H_{49}O_9N_1$, este esterul angelic [$CH_3 - CH = C(CH_3) - COOH$] al *veracevinei*.

Alți alcaloizi cu mare toxicitate sînt *stricnina*, *brucina* etc. Acești doi alcaloizi se găsesc în frunzele și semințele de turta lupului (*Strxchnos nux vomica*). Stricnina este o otravă puternică pentru rozătoare, păsări dăunătoare și cîrtițe. E toxică și pentru om.



Caracterul antibiotic al alcaloizilor este evident; el apare deci atît ca bactericid, cît și ca insecticid și în contra altor nevertebrate și vertebrate (zoocid).

Rolul fiziologic al acestor substanțe antibiotice din plantele superioare este de mijloc de apărare a plantelor contra dăunătorilor, mijloace pe care însă nu le poate totdeauna valorifica în mod spontan și direct. Într-adevăr, plantele care sintetizează alcaloizii cu acțiune toxică foarte puternică, cum sînt stricnina, nicotina etc., sînt totuși invadate și atacate de insecte, fără ca acestea să fie ucise. Dacă însă aceste plante sînt tratate cu soluții ale acestor alcaloizi, ale propriilor lor alcaloizi, acțiunea lor insecticidă se manifestă din plin. Acest mod de comportare este datorat faptului că plantele nu pot folosi singure uneori insecticidul pe care-l sintetizează, din cauza formei și a condițiilor în care el se găsește localizat în interiorul țesutului vegetal (frunze, semințe etc.).

★

Alcaloizii în sensul strict al cuvîntului sînt substanţele organice azotate de origine vegetală, avînd o structură ciclică, în numeroase cazuri complicată, cu azotul legat heterociclic, al căror caracter este bazic, pentru unii foarte slab, pentru cei mai mulţi extrem de pronunţat, care în majoritatea cazurilor au o puternică acţiune fiziologică — stimulatorie sau toxică — şi care prezintă un ansamblu de reacţii comune faţă de anumiţi reactivi chimici.

Luată într-un înţeles mai larg, noţiunea de alcaloizi cuprinde toţi compuşii azotaţi mai mult sau mai puţin bazici, de origine vegetală sau animală, indiferent dacă aceştia exercită sau nu vreo acţiune fiziologică şi indiferent dacă au o constituţie simplă, ciclică sau complexă.

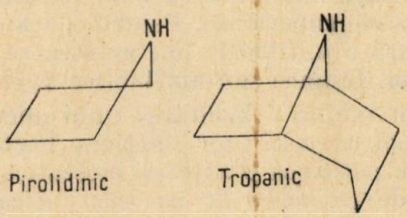
Alături de alcaloizii vegetali propriu-zişi stau deci şi unii compuşi bazici azotaţi animali, cu constituţie ciclică complexă, fiziologic activi sau nu, precum şi unele baze de origine vegetală sau animală cu constituţie simplă, dar fiziologic active, ca aminele aciclice simple sau şi cu alte funcţiuni, betainele, amidele, unii aminoacizi etc.

Substanţele de tip alcaloidic sînt foarte răspîndite, găsindu-se în mai toate organele şi ţesuturile vegetale şi animale (de exemplu colina şi colamina fosfoaminolipidelor, diferitele baze purinice şi piramidinice etc.).

Alcaloizii propriu-zişi (vegetali) au o largă răspîndire, ei nu apar însă decît în anumite plante sau familii de plante (mai ales în dicotiledonate, mai rar la monocotiledonate şi foarte rar la gimnosperme, pteridofite şi fungi), diferiţi alcaloizi sau diferitele grupe de alcaloizi fiind caracteristice pentru anumite specii sau familii de plante.

În regulă generală, un anumit alcaloid nu se găseşte decît într-o singură familie de plante, rar în mai multe. Pe de altă parte, aproape niciodată o plantă nu conţine numai un singur alcaloid, ci totdeauna o grupă de mai mulţi alcalozi, dintre care unii se găsesc în cantitate mai mare şi reprezintă deci alcaloizii principali ai plantei respective, iar alţii nu se găsesc decît în cantităţi uneori chiar extrem de mici. În orice caz, diferiţii alcaloizi care apar în aceeaşi plantă, şi al căror număr poate ajunge uneori la 20, sînt înrudiţi între ei din punct de vedere chimic, fiind în general fie izomeri, fie omologi, fie produşi de hidroliză, de reducere, de oxidare, de metilare etc. ai unei aceleiaşi substanţe fundamentale comune de la care derivă cu toţii; ei au deci o structură fundamentală comună, posedă acelaşi schelet şi nu diferă între ei decît prin modificări de detaliu. Din această cauză, între clasificarea alcaloizilor propriu-zişi după originea lor botanică şi clasificarea lor după constituţia chimică există un paralelism evident.

Sînt însă autori care pretind că într-o aceeaşi plantă coexistă mai multe tipuri de alcaloizi, cum ar fi, de exemplu, în *Erythroxylum coca*, unde apar atît alcaloizi cu nucleu pirolidinic, cît şi cu nucleu tropanic:



Dar şi aceste cazuri nu trebuie considerate ca abateri de la faptele formulate mai sus, deoarece, dacă ne uităm cu atenţie, între pirolidină şi tropan este o relaţie genetică şi structurală asemănătoare, tropanul nereprezentînd decît o formă de dezvoltare a nucleului pirolidinic, prin îngemănarea în plus şi a unui nucleu piperidinic, adică a unui homociclu.

În natură, alcalozii propriu-zişi se găsesc rareori liberi; ei apar mai ales combinaţi cu săruri, în special cu acizii oxalic, succinic, malic, tartric, citric, apoi cu taninul, mai rar cu acizii acetic, lactic, fumaric, aconitic, meconic, veratric, fosforic, sulfuric etc.

Într-un anumit stadiu de dezvoltare a plantei, alcaloizii se găsesc în toate organele plantei. Cantităţile în care alcaloizii apar în diferitele plante sînt în general foarte reduse, iar localizarea lor în diferitele ţesuturi ale plantei variază foarte mult de la plantă la plantă; astfel, în unele cazuri alcaloizii apar îndeosebi în seminţe sau fructe, alteori în frunze sau în rădăcini sau coajă etc.

Găsindu-se sub formă de săruri solubile, alcaloizii se pot extrage din plante prin tratarea cu apă sau alcool a materiei prime pulverizate; pentru cazul cînd alcaloizii se găsesc în plante ca baze libere, extracţia se poate face cu apă acidulată.

Clasificarea alcaloizilor se poate face după originea lor botanică, după înrudirea lor genetică şi după structura lor chimică.

După structura lor chimică, alcaloizii, în înţelesul larg al cuvîntului, se pot clasifica în patru mari categorii de baze naturale, şi anume:

1) baze alifatice, ca aminele simple (mono-, di- şi trimetilamina), diaminele (cum sînt putrescina şi cadaverina), betainele, aminoalcooli (cum sînt colina şi colamina), aminoacizii amfoteri şi bazici mai ales (ca lizina, arginina, ornitina);

2) baze aromatice, ca tirozina, adrenalina;

3) amide, ca polipeptidele şi proteinele cu caracter bazic (ca histonele şi protaminele, ureea şi ureidele);

4) baze heterociclice, ca alcaloizii heterociclici de origine animală şi ca totalitatea alcaloizilor vegetali propriu-zişi, bine clasificate de Bodea [1].

Alcaloizii nu par a fi substanţe de interes vital deoarece nu au o răspîndire universală în organismele vegetale; ei sînt produşi de eliminare a azotului rezultat în procesele de degradare metabolică a protidelor. Datorită însă faptului că unii manifestă o acţiune bactericidă şi una toxică asupra organismului animal, alcaloizii pot fi consideraţi şi ei ca substanţe de apărare a plantelor contra dăunătorilor, deci ca antibiotice.

Ca şi alte antibiotice din plantele superioare, alcaloizii pot manifesta nu numai o acţiune inhibitorie, ci şi o acţiune stimulatorie asupra organismelor.

În rezumat, substanţele antibiotice, care au fost identificate mai întîi printre produşii activităţii metabolice a unor bacterii sau alte microorganisme, apar şi în plantele superioare. Pentru a arăta originea microbiană sau vegetală superioară a antibioticelor, acestea se vor numi antibiotice microbiene, bacteriene, fungice sau antibiotice vegetale.

Antibioticele pot inhiba dezvoltarea unui microorganism sau îl pot ucide: antibioticele pot avea sau nu o acţiune bacteriostatică sau bactericidă sau mai generic pot avea o acţiune biostatică sau biocidă. Această ultimă noţiune include pe aceea de bacteriostatică sau bactericidă; ea

include însă şi acţiunea inhibitorie sau destructivă, pe care un antibiotic o poate avea asupra unui organism superior.

Antibioticele bacteriene, respectiv cele vegetale, pot avea deci fie o acţiune bactericidă sau fungicidă, fie o acţiune zoocidă.

Acest fel de a defini un antibiotic şi acţiunea lui face ca noţiunea de fitoncid, dată antibioticelor volatile din plantele superioare să nu mai aibă înţeles.

Prezentată la redacţie la 28 februarie 1969

Institutul agronomic „Nicolae Bălcescu", Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bodea C., *Tratat de biochimie vegetală*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1965–1966.
2. Bonnemaison L., *Les ennemis animaux des plantes cultivées et des forêts*, Paris, 1961–1963.
3. Davidescu D., Ionescu Mircea, Sluşanschi H., Ivănescu M., Pvlovschi Gh. *Metode de analiză chimice şi fizice folosite în agricultură*, Edit. Academiei, R.P.R., Bucureşti, 1963.
4. Karlson P., *Biochimie*, Doin, 1964.
5. Manolache C., Boguleanu Gh., *Entomologie agricolă*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1967.
6. Neniţescu C. D., *Tratat elementar de chimie organică*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1966.
7. Popa C., Drimuş R., *Chimia produselor fitofarmaceutice*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1965.
8. Rădulescu E., şi colab., *Tratat de fitopatologie agricolă*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1967.
9. Săulescu N., Popa T., Negoescu M., *Influenţa clorurii de clorcolină asupra grîului de toamnă*, Probleme agricole, 1966.
10. Săulescu N., Ionescu Emanuela, Ionescu Mircea, *Influenţa clorurii de clorcolină asupra producţiei şi calităţii recoltelor de grîu*, Com. ştiinţ. IANB, **II**, 1969.
11. Sisto A., *Nanizzanti ed allelamento*, L' Italia Agricola, **11** (1965).
12. Soru E., *Biochimie medicală*, Edit. de Stat, Bucureşti 1953.

ST. CERC. BIOCHIM., **13**, *1*, 103–108, (1970)

RECENZII

SOME RECENT ADVANCES IN INBORN ERRORS OF METABOLISM (*Unele progrese în erorile congenitale de metabolism*). *Proceedings of the Fourth Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, held in Dublin, July 1966*, sub red. K.S. Holt şi V. P. Coffey, E. & S. Livingstone LTD, Edinburgh–Londra, 1968, 167 p.

Acest simpozion şi-a axat lucrările pe o serie de probleme actuale în domeniul metabolismului, accentul principal punîndu-se pe coroborarea datelor clinice cu investigaţiile biochimice de laborator.

Fiecare din lucrările publicate în cele patru părţi ale volumului cuprinde un bogat material iconografic şi bibliografic. Este meritul redactorilor de a fi inserat şi discuţiile purtate pe marginea referatelor.

Prima parte cuprinde două referate: *Rolul pteridinelor în dereglările metabolice* de W. Jacobson, în care, după un studiu teoretic asupra rolului pteridinelor în metabolism, autorul corelează regimul alimentar al bolnavilor cu fenilcetonurie cu testul de încărcare la fenilalanină; în al doilea referat, *Fenilcetonuria maternă şi leziunile cerebrale fetale*, de J. D. Allan şi J. K. Brown, bogat documentat din punct de vedere clinic şi de laborator (investigaţii biochimice multiple), se preconizează examinarea complexă a urinii gravidelor pentru depistarea precoce a unor eventuale dereglări metabolice.

În partea a doua sînt prezentate trei referate. Primul, intitulat *Erori înnăscute de metabolism asociate cu leziuni cerebrale*, de H. Bickel, constituie un îndreptar în investigarea bolnavilor cu deficit mintal, pe baza unui material de 1 000 de cazuri de oligofrenie prin deficite metabolice înnăscute. În cel de-al doilea referat, *Aspectele EEG la bolnavii cu fenilcetonurie*, de J. R. Poley şi G. Dumermuth, se arată că nu există un aspect EEG patognomonic unei anumite afecţiuni metabolice, însă, în general, gravitatea alterărilor EEG este dependentă de gradul deficitului intelectual. Aspectul EEG constituie un indiciu preţios în prognostic şi în dirijarea tratamentului. La concluzii similare ajunge şi G. Pampiglione în comunicarea *Unele dismetabolii înnăscute interesînd electrogeneza cerebrală*, urmărind evoluţia EEG în timp, cu şi fără activare.

A treia parte cuprinde trei lucrări asupra deficitelor metabolice hidrocarbonate: *Intoleranţele dizaharidice*, de A. Holzel, *Intoleranţele monozaharidice*, de J.A. Black, şi o prezentare de caz expusă de R. Gitzelmann, *Deficitul în galactokinază — o nouă eroare înnăscută de metabolism*.

Cea de-a patra parte cuprinde patru referate. În primul, *Histochimia inervaţiei intrinsece a rectului şi colonului*, E. Finch, J. L. Emery şi J. Lister expun un studiu interesant asupra localizării colinesterazei şi monoaminooxidazei în ţesutul nervos digestiv. Al doilea şi al treilea referat, intitulate *Gargoilism: aspecte biochimice*, de J.R. Baker, şi *Gargoilism: aspecte clinice*, de V. P. Coffey, constituie o sinteză documentată a acestor cazuri, cu discutarea problemelor de diagnostic pozitiv şi diferenţial care se ridică în clinică. Ultima lucrare, *Distrofia musculară facio-scapulo-humerală şi aminoaciduria*, de N.A.J. Carson şi colab., expune această maladie pe baza schemelor rezultatelor clinice şi de laborator obţinute.

Lucrările simpozionului de la Dublin sînt deosebit de interesante, înglobînd multe probleme de primă importanţă în depistarea şi profilaxia afecţiunilor metabolice înnăscute. Varietatea tematicii abordate şi a mijloacelor tehnice folosite în cercetări reţine atenţia clinicienilor şi biochimiştilor, precum şi a oricărui om de ştiinţă interesat în probleme de genetică umană.

Karin Crainic
Institutul de medicină legală
„Prof. dr. Mina Minovici"

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE MAMMALIAN SURFACE MEMBRANE (*Proprietățile biologice ale membranelor de suprafață ale celulelor de mamifere*), sub red. L. A. MANSON, The Wistar Institute Press, Philadelphia, 1968, 160 p.

Cartea cuprinde o colecție de articole prezentate la simpozionul Institutului Wistar de anatomie și biologie, care a avut loc în aprilie 1967. Materialul este împărțit pe șase probleme : izolarea, compoziția și biochimia membranelor ; citochimia membranelor ; metabolismul lipidic și structura membranelor ; hidrații de carbon, enzimele etc. ; imunologia membranelor ; interacțiuni celulă-virus. Fiecare parte este însoțită de discuții, iar la sfîrșitul cărții există o rezumare a lucrărilor făcută de dr. P. Siekiewitz. Acesta a încercat să facă o apreciere generală asupra problemei, subliniind măsura în care „noi putem să izolăm, să atacăm sau, eventual, să anihilăm membranele celulare sau le lăsăm în pace să existe și să-și exprime activitatea lor biologică".

Dintre articolele publicate am notat : lucrarea lui N. G. Anderson consacrată izolării membranelor celulare din ficatul de șobolan prin centrifugare combinată diferențială și izopicnică, localizarea enzimelor legate de membrană prin citochimie la microscopul electronic (V. T. Marchesi), comentariile lui L. Weiss cu privire la ARN ca un component normal al periferiei celulare și studiile consacrate conținutului în aloantigenul H—2 al membranei de suprafață a celulelor de șoarece, prezentate de editorul cărții și de colaboratorii săi.

Scopul simpozionului — și cel al cărții — a fost de a prezenta și discuta și alte funcțiuni ale membranelor celulare decît permeabilitatea, încercînd să se găsească corelații între organizarea macromoleculelor, a membranelor și diferite proprietăți ale acestora, ca : structura antigenică, funcțiile receptorilor, turnoverul lipidelor, localizarea enzimelor etc.

Victor Gheție
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

CELL STRUCTURE AND ITS INTERPRETATION (*Structura celulară și interpretarea ei*), Essays presented to John Randal Baker F.R.S., sub red. S.M.Mc GEE-RUSSEL și K.F.A. Ross, Edward Arnold (Publishers) Ltd., Londra, 1968, 449 p.

Cartea este un omagiu adus profesorului J. Randal Baker, articolele fiind scrise de foștii săi discipoli. Este de menționat prezentarea prof. Baker ca citologist, cu întreaga bibliografie a lucrărilor sale.

Cum cercetările prof. Baker în biologia celulară au cuprins un număr mare de domenii, articolele adunate în acest volum sînt prezentări de ansamblu ale lucrărilor din domenii foarte variate ale citologiei. Astfel, cartea este de fapt un manual foarte modern de citologie. Se insistă asupra necesității unirii studiilor celulare făcute cu ambele forme de microscop (obișnuit și electronic) și se descriu tehnicile de interpretare comune ambelor aparate.

Din cele patru părți ale volumului, prima este dedicată interpretării calitative a structurii celulare. Se discută problemele fixării și ale diferențierii prin colorare și contrast la microscopul obișnuit și prin contrast la microscopul electronic. De menționat articolele : *Activitatea biologică a roșului neutru* și *Răspunsul celular la colorarea vitală*. Tot aici sînt incluse și articolele privi-

toare la histochimia şi organizarea structurii intracelulare şi a produşilor celulari (fosfolipide, lipocondria, lizozomi).

Partea a doua este dedicată informărilor obţinute prin tehnici noi cantitative (histochimie enzimatică cantitativă etc.).

Partea a treia prezintă aportul studiilor citologice ale structurilor celulare la interpretarea activităţii celulelor specializate. Aici sînt incluse şi articolele referitoare la degenerarea structurilor celulare.

Partea a patra prezintă directive de interpretare a structurii celulare.

Volumul este editat în condiţii grafice excepţionale, cu 77 de fotografii excelente, obţinute fie cu microscopul obişnuit, fie cu microscopul electronic.

Recomandăm călduros acest volum tuturor acelora care lucrează cu microscopul.

Cecilia Motaş
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

P. J. WHEATLEY, THE DETERMINATION OF MOLECULAR STRUCTURE (*Determinarea structurii moleculare*), ediţia a II-a, Clarendon Press, Oxford, 1968, 265 p.

Cartea este o introducere în principalele metode fizico-chimice care pot fi întrebuinţate la determinarea simetriei moleculare sau a geometriei moleculare. Fiecare tehnică este discutată din punctul de vedere al nespecialistului care doreşte să cunoască metoda cea mai potrivită pentru o moleculă dată. Se arată scopul şi limitele fiecărei metode, ilustrîndu-se cu exemple luate din lucrări originale. S-au omis calculele matematice lungi, iar ecuaţiile de bază sînt introduse fără comentarii.

Prima parte se ocupă de metodele spectroscopice. Sînt prezentate consideraţii generale, spectrele de rotaţie pură (spectroscopia microundelor) şi spectrele de vibraţie-rotaţie.

Partea a doua prezintă metodele de difracţie : difracţia electronilor, difracţia neutronilor şi difracţia în raze X, cu consideraţii generale, determinarea simetriei moleculare şi determinarea parametrilor moleculari.

Partea a treia cuprinde metodele clasice stereochimice, momentul de dipol, metode magnetice şi rezonanţa magnetică nucleară.

Faţă de prima ediţie din 1959, aceasta are capitolele de difracţie în raze X şi rezonanţa magnetică nucleară mult mărite şi modificate, reflectînd progresele considerabile făcute în ultimii ani.

De menţionat faptul că fiecare capitol are trecute în bibliografie tratatele care se ocupă *in extenso* de metodele respective.

Cecilia Motaş
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

H. MOHR, LEHRBUCH DES PFLANZENPHYSIOLOGIE (*Manual de fiziologia plantelor*), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1969, 408 p., 397 fig.

Manualul de faţă este cu atît mai binevenit cu cît literatura din acest domeniu nu este foarte bogată. El cuprinde toate capitolele fiziologiei vegetale clasice, dar autorul şi-a propus nu inventarierea exhaustivă a tuturor ipotezelor şi teoriilor fiziologiei vegetale,ci introducerea cititorului în problemele importante ale acestei ştiinţe, astfel încît acesta să-şi poată face o imagine despre căile de cercetare în fiziologia vegetală, modul de formulare a ipotezelor şi teoriilor, pornind de la datele experimentale.

Faptul că problemele de fiziologia dezvoltării şi fotosinteză ocupă mai mult de o treime din totalul paginilor denotă caracterul „la zi" al cărţii. Remarcabil este şi modul de tratare, de pe baze moderne, al tuturor problemelor prezentate, uzînd de date termodinamice, fizice, chimice.

În afara indicaţiilor de literatură ce însoţesc fiecare capitol, cartea are şi o listă bibliografică cuprinzătoare, precum şi un index de subiecte. Trebuie remarcată de asemenea bogata ilustraţie a lucrării,

Cartea se adresează în primul rînd tinerilor biologi, ca şi tuturor celor ale căror cercetări au ca obiect planta.

Constanţa Muşolan
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

T. DEVENYI, P. ELÖDI, T. KELETI, G. SZABOLCSI, STRUKTURELLE GRUNDLAGEN DER BIOLOGISCHEN FUNKTION DER PROTEINE (*Bazele structurale ale funcţiei biologice a proteinelor*), Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1969, 735 p.

În ultimii 10 ani, studiul structurii proteinelor a luat o amploare deosebită, încît la ora actuală volumul de informaţii privitoare la această problemă este apreciabil. De aceea, orice lucrare de sinteză a acestor informaţii este binevenită, mai ales cînd se dovedeşte a fi realizată cu competenţă, cum este cazul volumului de faţă, care se caracterizează printr-un înalt nivel ştiinţific, ca şi prin bogata documentaţie, la zi, a fiecărui capitol. Autorii au realizat o izbutită coroborare a datelor chimice, fizico-chimice şi matematice, legate de structura proteinelor, cu cele biologice, care reflectă funcţiile acestor substanţe.

Sînt descrise diferite metode de cercetare a structurii primare a proteinelor, ca şi a structurii lor spaţiale, cu exemple de stabilire a acestor structuri. Relaţia structură-funcţie este şi ea evidenţiată, iar un spaţiu amplu este acordat cercetării de biochimie comparată a proteinelor şi prezentării bazelor structurale ale acţiunii enzimatice.

Prin tematica abordată şi prin modul de tratare, această carte este deosebit de utilă biologilor, chimiştilor şi medicilor interesaţi în studiul structurii şi funcţiei proteinelor.

Constanţa Muşolan
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIOCHEMISTRY OF EXERCISE (*Biochimiq efortului*), sub red. J. R. POORTMANS, S. Karger, Basel — New York, 1969, 384 p., 127 fig. 83 tab.

Biochimia efortului muscular a început să fie studiată în ultimii ani din ce în ce mai intens şi mai complex. Ca o urmare firească a acestei activităţi colective de cercetare, efectuată în numeroase laboratoare din lume, în iunie 1968 s-a ţinut la Bruxelles primul simpozion internaţional de biochimie a efortului. Volumul de faţă cuprinde 58 de lucrări originale susţinute la acest simpozion, selecţionate dintr-un total de 73 de lucrări.

Fiecare lucrare are o bibliografie amplă, un capitol de metodică amănunţit prezentat, precum şi descrierea unor rezultate deosebit de interesante.

Lucrările sînt ordonate în 6 capitole, şi anume : *Gazele şi metaboliţii din sînge în chimia balanţei acido-bazice* (cap. I, 12 lucrări) ; *Metabolismul carbohidraţilor şi lipidelor* (cap. II, 13 lucrări) ; *Hormonii* (cap. III, 8 lucrări) ; *Enzimele* (cap. IV, 10 lucrări), *Electroliţii* (cap. V, 4 lucrări) ; *Proteinele în lichidele biologice* (cap. VI, 11 lucrări).

Fiecare din aceste 6 capitole începe cu o prezentare generală a principalelor aspecte cunoscute în domeniul respectiv, făcută de către biochimişti cu renume, ca : M. Scherrer (Elveţia), S. Fröberg (Suedia), F. W. Schmidt (R. F. a Germaniei), U. S. von Euler (Suedia), G. Rougier (Franţa) şi J. R. Poortsmans (Belgia).

Din materialele care formează primul capitol se desprinde ideea că atît echilibrul acido-bazic, cît şi concentraţiile unor metaboliţi (ca : acizii lactic şi piruvic) sau substanţele de rezervă (ca glicogenul şi acizii graşi) sînt în mod evident modificate în cursul eforturilor fizice de durate diferite. Determinările au fost efectuate pe sînge sau pe muşchii unor subiecte umane sau animale de experienţă. Rezultatele obţinute scot în evidenţă factori de control şi de reglare, care nu în toate cazurile sînt binecunoscuţi.

În cel de-al doilea capitol sînt prezentate rezultatele privind metabolismele lipidelor şi glucidelor, participarea acestora în cursul efortului muscular, precum şi modul în care se refac rezervele energetice consumate.

Dependenţa dintre efortul fizic şi activitatea simpatico-adrenală, precum şi secreţia de tiroxină, insulină şi de hormoni hipofizali în cursul eforturilor fizice constituie subiectul lucrărilor care formează cel de-al treilea capitol.

Studiul variaţiei activităţii unui număr ridicat de enzime serice sau tisulare constituie subiectul celui de-al patrulea capitol. Sînt studiate, printre altele, lactícodehidrogenaza, aldolaza, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza, creatinkinaza, transaminazele. De asemenea, sînt semnalate şi modificări ale aspectului citologic al animalelor antrenate.

Variaţia ionilor de sodiu, potasiu, calciu şi magneziu din ser şi muşchi formează capitolul al cincilea, care cuprinde 4 lucrări.

În ultimul capitol sînt comentate rezultatele obţinute pe cale electroforetică şi cromatografică referitor la proteinele din urină şi transpiraţie, la variaţia unor componente serice, ca acidul sialic, seromucoidul, precum şi la alte aspecte ale participării metabolismului proteic în efort.

Iniţiativa de a uni într-un volum unitar lucrările primului simpozion consacrat biochimiei efortului muscular va constitui, fără îndoială, un imbold pentru cercetări ulterioare în această direcţie.

D. Tănăsescu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIOCHEMIE DES SAUERSTOFFES. 19. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 24—27. April, 1968 in Mosbach/Baden (*Biochimia oxigenului.* Al 19-lea Colocviu al Societății de chimie biologică, 24—27 aprilie 1968, Mosbach/Baden) prelucrat de B. Hess și Hj. Staudinger, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg-New York, 1968.

Volumul cuprinde aspectele esențiale ale biochimiei oxigenului, prezentate în 1968 la Colocviul din Mosbach (R.F.G.) de oameni de știință renumiți prin contribuțiile lor hotărîtoare în dezvoltarea cunoștințelor din acest domeniu.

După o scurtă introducere, în care Hj. Staudinger prezintă succint fazele descoperirii și studierii oxigenului și ale enzimelor activatoare ale acestuia, D. Samuel aprofundează chimia fizică și teoretică a oxigenului. În continuare, H.C. Watson și C.L. Nobbs relatează despre fixarea oxigenului de combinațiile oxigeno-transportatoare ale hemului, insistînd mai ales asupra fixării lui de mioglobină. Despre transportul în organism al oxigenului, precum și despre concentrația acestuia la nivelul locurilor lui de utilizare raportează D. W. Lübbers, iar despre reducerea oxigenului în lanțul respirator B. Chance și M. Pring. Următorul articol, prezentat de R. W. Estabrook și colab., este consacrat rolului citocromului P—450 și al oxigenazelor de funcțiuni mixte. Un alt referat consacrat oxigenazelor este semnat de O. Hayaishi și colab. Modul prin care oxigenul poate fi redus și activat este arătat de V. Ullrich și Hj. Staudinger. Urmează apoi un articol consacrat fotosintezei, de H. T. Witt și colab., și, în sfîrșit, articolul lui G. Schatz și R.S. Criddl asupra acțiunii oxigenului ca inductor al enzimelor respiratorii.

Fiecare articol este completat în mod fericit, în cadrul discuțiilor, cu un coreferat și cu stenograma discuțiilor libere purtate pe marginea materialelor prezentate. Volumul se încheie cu schițarea perspectivelor de viitor în cercetarea reacțiilor biochimice ale oxigenului, desprinse din materialele prezentate și discuțiile purtate, semnate de B. Hess.

Volumul, scris aproape în întregime în limba engleză, este îngrijit prezentat, cuprinde 365 pagini și 188 figuri și se recomandă tuturor biochimiștilor, biologilor și fiziologilor.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1970 FEB 28

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali,** 1966, 25 × 17,50, 375 p. + 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie,** 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies,** 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN,** 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF. 25 — DM. 20 — Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 13, NR. 1, P. 1—108, BUCUREŞTI, MARTIE, 1970

I. P. „Informaţia" — c. 4146

43816

Lei 20.—

F 1330
04/1

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 13
1970

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 2, p. 109—214, Bucureşti, iunie, 1970

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România;
M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU;
VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.
Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Centrala cărții, Oficiul de comerț exterior, Căsuța poștală 134—135 (Calea Victoriei 126), București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:
București, str. Docenților nr. 20
Sectorul I

E 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 13, nr. 2 1970

SUMAR

Pag.

V. ALEXANDRESCU, I. HAGIMA-CĂLIN, Peroxidaza din grîu în primele etape de creştere 113

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. VII. Diferenţierea conţinutului de aminoacizi, zaharuri şi substanţe aromatice, în corelaţie cu rezistenţa la ger 121

O. DREICHLINGER, G. DEUTSCH, Efectul unui compus piridiniuil-fenotiazinic asupra transportului activ de sodiu în celula renală 129

V. GHEŢIE, C. MOTAŞ, Catabolizarea imunoglobulinei G de către unele formaţiuni subcelulare bogate în lizozomi, izolate din ficatul de şobolan . . . 135

I. HURGHIŞIU, Influenţa virusurilor mozaicului conopidei (VMC) şi mozaicului castraveţilor (VMC') asupra conţinutului în aminoacizi liberi în anumite plante test 145

A. MIHĂESCU, Activitatea peroxidazică a sucurilor obţinute din frunzele de varză şi porumb preîncălzite la temperaturi diferite 151

S. MIHĂESCU, Purificarea parţială a catepsinei D din ficatul de şobolan . . . 155

I. A. MOLNAR, J. WINTER, M. SIMIONOVICI, Mucopolizaharide din intestine de pasăre 163

C. MOTAŞ, Distribuţia proteazelor între formaţiunile intracelulare de ficat de şobolan 169

D. TĂNĂSESCU, TR. BENŢIA, Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor sarcoplasmatice tratate cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen 179

H. D. SCHELL, Comportarea proteinelor sarcoplasmatice faţă de unele săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben în filogenie 183

F. ZETEA, C. BODEA, Conţinutul în proteină totală şi zeină al boabelor unor hibrizi de porumb în comparaţie cu genitorii lor 189

REFERAT GENERAL

C. VELICAN, „Îmbătrînesc" macromoleculele? 193

RECENZII 207

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 2, p. 109—214, Bucureşti, iunie, 1970

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tome 13, Nr. 2 1970

CONTENTS

Page

V. ALEXANDRESCU, I. HAGIMA-CĂLIN, Wheat peroxidase during the first developing stages 113

I. BRAD, Contributions to the biochemical study of autumn cereal frost resistance. VII. Differentiation of amino acid, carbohydrate and aromatic substance content as related to frost resistance. 121

O. DREICHLINGER, G. DEUTSCH, Effect of a phenothiazine-pyridinium compound on the active transport of natrium in the kidney cell 129

V. GHEŢIE, C. MOTAŞ, Catabolism of immunoglobuline G by some lysosome-rich subcellular fractions isolated from rat liver 135

I. HURGHIŞIU, The influence of cauliflower mosaic (CIMV) and cucumber mosaic (CMV) viruses on amino acid content in certain test plants . . 145

A. MIHĂESCU, Peroxidase activity of saps obtained from cabbage and maize leaves, preheated at different temperatures 151

S. MIHĂESCU, Partial purification of cathepsin D from rat liver 155

I. A. MOLNAR, J. WINTER, M. SIMIONOVICI, Mucopolysaccharides from fowl intestine 163

C. MOTAŞ, The distribution of proteases on subcellular fractions of rat liver . 169

D. TĂNĂSESCU, TR. BENŢIA, Polyacrylamide gel electrophoresis of the sarcoplasmatic proteins incubated with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene . . 179

H. D. SCHELL, Behaviour of sarcoplasmatic proteins in phylogeny against some quaternary ammonium salts derived from stilbene 183

F. ZETEA, C. BODEA, Total protein and zein content in seeds of some corn hybrids as compared to their genitors 189

REVIEW

C. VELICAN, Are the macromolecules aging? 193

BOOK REVIEW 207

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 2, p. 109–214, Bucureşti, iunie 1970

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 113–120 (1970)

PEROXIDAZA DIN GRÎU ÎN PRIMELE ETAPE DE CREŞTERE

VICTORIA ALEXANDRESCU şi IOANA HAGIMA-CĂLIN

Rezumat. — Activitatea peroxidazică la grîu este apreciabilă şi creşte continuu în perioada germinării atît în plantulă, cît şi în restul seminţei. În perioada vegetativă, ea este scăzută în coleoptil şi în primele frunze şi de 2—3 ori mai mare în rădăcini. Peroxidaza din grîu este foarte eterogenă din punctul de vedere al sarcinii electrice globale, evidenţiindu-se sub forma a 7—11 fracţiuni. În toată perioada cercetată, formele moleculare evidenţiate sînt în majoritate electronegative şi doar două sînt electropozitive. Apariţia noilor forme moleculare enzimatic active are loc cu sau fără modificarea activităţii totale. Soiurile de grîu de toamnă şi de primăvară cercetate sînt asemănătoare atît din punctul de vedere al dinamicii peroxidazei, cît şi al evoluţiei formelor moleculare evidenţiate în primele 15 zile de creştere.

Peroxidaza din germenii de grîu a fost separată prin precipitări fracţionate în doi componenţi, dintre care unul ar fi forma nativă, pe cînd al doilea ar fi o formă modificată [1], [2]. Recent însă, prin separare pe schimbători de ioni, s-a arătat existenţa a două clase de peroxidaze, fiecare clasă deosebindu-se prin proprietăţile sale ionice, prin eterogenitatea la electroforeza în disc şi prin proprietăţile cinetice [3].

Peroxidaza din plantulele de grîu de 4—5 zile a fost cercetată prin electroforeza în gel de poliacrilamidă, stabilindu-se 5—8 fracţiuni majore la diferite pH-uri, comune grupelor taxonomice studiate, independent de gradul lor de ploidie [4], [5].

Peroxidaza din frunzele de grîu s-a cercetat prin electroforeză la pH 5,5 în gel de agar, atît în cazul creşterii lor la 6°C, cît şi la 20°C, stabilindu-se că nu există diferenţe calitative majore [6].

În lucrarea de faţă prezentăm un tablou al peroxidazei din grîu (de toamnă şi de primăvară) în primele 15 zile de la începerea germinării. S-a urmărit în primul rînd dinamica peroxidazei din punct de vedere cantitativ, prin determinarea intensităţii activităţii, şi, în paralel, evoluţia peroxidazei sub raportul formelor moleculare separabile pe cale electroforetică. În al doilea rînd, s-au urmărit în paralel grîul de toamnă şi cel de primăvară, pentru a se stabili dacă soiurile cercetate prezintă în primele etape de creştere aceeaşi dinamică a activităţii peroxidazice şi aceleaşi forme moleculare. Pentru aceasta s-au examinat extractele diverselor ţesuturi, iar la plantule şi frunze, în plus, sucul lor vacuolar.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe grîu de toamnă F.1—63 (procurat de la I.C.C.P.T.-Fundulea) şi grîu de primăvară Superelită Măgurele-7 (de la I.C.C.S.-Braşov).

Seminţele de grîu (*Triticum aestivum*) negerminate s-au trecut printr-o moară de laborator. Făina obţinută s-a cernut printr-o sită cu ochiuri de 0,4 mm. Seminţele ce urmau să fie supuse germinării s-au dezinfectat în prealabil prin ţinerea lor, timp de 10 min, într-o soluţie de apă oxigenată 3%, apoi s-au lăsat să germineze la întuneric, în cutii Petri, pe hîrtie de filtru. Plantula (coleoptil plus rădăcinile) s-a separat manual de restul seminţei după 2, 5 şi 8 zile de germinare. În a 5-a zi s-au obţinut şi extracte, separat, din coleoptil şi rădăcini. Pentru frunze, seminţele s-au semănat în cutii cu pămînt şi plantele au fost crescute la lumină artificială, recoltîndu-se toată masa verde la 11, 13 şi 15 zile de la semănare, adică la 8, 10 şi 12 zile de la răsărire. Au fost crescute plante şi la întuneric, iar frunzele etiolate s-au recoltat după 12 zile de la semănare. Frunzele s-au trecut printr-o moară de laborator.

S-au preparat extracte proteice brute, folosind ca extractant soluţia de NaCl 9‰, raportul de extracţie fiind dat în tabelele prezentate. Extracţia s-a efectuat timp de o oră la temperatura camerei şi a fost urmată de centrifugarea extractelor la rece, la 4500 g, timp de 15 min.

Determinarea activităţii peroxidazei s-a făcut în ziua extracţiei, iar electroforeza în aceeaşi zi sau a doua zi, din aceleaşi supernatante. În cazurile în care activitatea peroxidazică era prea slabă, extractul fie că s-a concentrat prin perevaporare într-un curent puternic de aer rece, fie că s-a micşorat raportul de extracţie. S-a evitat să se lucreze cu extracte mai vechi sau liofilizate, deoarece în aceste cazuri numărul fracţiunilor evidenţiate era mai mic.

Sucul vacuolar din plantule şi din frunze s-a obţinut prin presare la 150 atm, cu o presă Hafico [7].

Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,5% (Special Agar Noble-Difco Laboratories), cu tampon de acid boric 0,2 M — borax 0,05 M, pH 8,2, pe plăci de 15 × 3 cm, timpul de migrare fiind de 5 ore; pentru plăci s-a utilizat acelaşi tampon, diluat cu două părţi de apă distilată. S-a lucrat la 180 V, cu 0,5 mA/cm.

Determinarea activităţii peroxidazei în extracte şi pe plăci s-a făcut în modul arătat într-o lucrare anterioară [8].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea peroxidazei. Date fiind dimensiunile mici ale axului embrionar şi ale scutelului seminţei de grîu, precum şi greutăţile întîmpinate în separarea lor, pentru stadiul de sămînţă am lucrat cu făina totală. În acest caz rezultatele reflectă în special comportarea endospermului, după cum s-a arătat pentru fosfataza acidă [9]. Activitatea peroxidazică, în cazul seminţelor de grîu de primăvară şi de toamnă negerminate, este redată în tabela 1. Se constată o activitate peroxidazică

apreciabilă, mai ales dacă o comparăm cu activitatea peroxidazică a semințelor de porumb HD 336, care este de aproximativ de 20 de ori mai slabă [8].

În perioada germinării, activitatea peroxidazică a plantulei ambelor soiuri de grîu crește în primele două zile. Creșterea continuă mai slab pînă în ziua a 5-a, pentru ca în a 8-a zi de germinare să găsim o activitate aproximativ de același ordin de mărime cu cea din ziua a 5-a (tabela 1).

Activitatea peroxidazică a restului seminței este, după 2 zile de germinare, de același ordin de mărime (la grîul de primăvară) sau chiar mai mică (la grîul de toamnă) decît a seminței negerminate. Ulterior însă, activitatea crește rapid pînă în ziua a 5-a, apoi mult mai lent pînă în ziua a 8-a de germinare (tabela 1).

Tabela 1

Activitatea peroxidazică a semințelor de grîu negerminate și în timpul germinării (activitatea s-a apreciat după gradul de diluție necesar pentru ca 1 ml de extract diluat să oxideze total o cantitate fixă de benzidină la 37°C, în 30 s)

	Materialul examinat	Zile de germinare	Raport de extracție ml/g	Diluția %
Grîu de toamnă	sămînță negerminată	0	2/1	15,55
	plantulă	2	1/1	6,25
		5	,,	4,49
		8	,,	4,70
	restul seminței	2	1,5/1	35,29
		5	,,	6,31
		8	,,	4,00
Grîu de primăvară	sămînță negerminată	0	2/1	23,80
	plantulă	2	1/1	5,48
		5	,,	4,08
		8	,,	4,39
	restul seminței	2	1,5/1	23,52
		5	,,	6,00
		8	,,	4,00

La o altă serie de semințe puse la germinat, în ziua a 5-a am comparat activitatea peroxidazei din coleoptil, rădăcini, plantula întreagă, sucul vacuolar al plantulei și restul seminței (tabela 2). Din tabela 2 reiese că coleoptilul este organul cu activitatea peroxidazică cea mai slabă. Comparînd activitatea sucului vacuolar al plantulei cu aceea a extractului din plantula întreagă și din coleoptil și rădăcini și ținînd seama că majoritatea sucului vacuolar se obține din coleoptil și mai puțin din rădăcini,

se pare că peroxidaza este localizată în special în sucul vacuolar al plantulei. Ambele soiuri de grîu prezintă valori asemănătoare. Petrocenko şi Kolesnikov [10], studiind localizarea peroxidazei din rădăcinile de grîu, au stabilit că ea se găseşte în sucul celular, şi nu în plastide, mitocondrii şi microzomi. Lanzani şi Galante [11], care au studiat localizarea peroxidazei în germenii de grîu, au stabilit existenţa unei peroxidaze solubile şi a alteia asociate cu ribozomii. În condiţiile noastre de lucru, ribozomii

Tabela 2

Activitatea peroxidazică a diferitelor părţi ale seminţei de grîu germinate 5 zile (activitatea s-a apreciat după gradul de diluţie necesar pentru ca 1 ml de extract sau de suc vacuolar diluat să oxideze total o cantitate fixă de benzidină la 37°C, în 36 s).

	Materialul examinat	Raport de extracţie ml/g	Diluţia %
Grîu de toamnă	coleoptil-extract	1/1	8,6
	rădăcină-extract	,,	3,00
	plantulă-extract	,,	3,70
	plantulă-suc vacuolar	—	3,00
	restul seminţei-extract	1,5/1	3,30
Grîu de primăvară	coleoptil-extract	1/1	8,10
	rădăcină-extract	,,	3,30
	plantulă-extract	,,	4,30
	plantulă-suc vacuolar	—	3,40
	restul seminţei-extract	1,5/1	5,10

din extracte rămîn în tot cazul în supernatant, fapt care ne duce la ideea că, la grîu, forma cea mai activă este cea solubilă.

Activitatea peroxidazei din grîu se menţine, în toată perioada de germinare, la un nivel mult mai ridicat decît cea din porumb. Peroxidaza din porumb se găseşte însă nu atît în sucul vacuolar, cît mai ales în restul celulei, ceea ce arată că forma cea mai activă este, probabil, cea legată de ribozomi [8].

Frunzele de grîu conţin o activitate peroxidazică slabă faţă de coleoptilul de grîu (tabela 3), dar, comparativ cu frunzele de porumb, activitatea se menţine la un nivel mult mai ridicat. În perioada cercetată se pot observa variaţii de 20—25% în sensul măririi sau micşorării activităţii ei. O situaţie similară se constată în ceea ce priveşte activitatea peroxidazică a sucului vacuolar al frunzelor respective. Din examinarea valorilor obţinute în cazul extractelor şi al sucurilor vacuolare se con-

Tabela 3

Activitatea peroxidazică a frunzelor de grîu
(activitatea s-a apreciat după gradul de diluţie necesar pentru ca 1 ml de extract sau de suc vacuolar diluat să oxideze total o cantitate fixă de benzidină la 37°C, în 75 s).

	Frunze	Zile de creştere	Raport de extracţie ml/g	Diluţia %
Grîu de toamnă	normale — extract	11	0,4/1	5,20
		13	,,	5,43
		15	,,	4,16
	normale — suc vacuolar	11	—	7,40
		13	—	8,33
		15	—	8,49
	etiolate — extract	12	0,4/1	5,42
	etiolate — suc vacuolar	12	—	6,00
Grîu de primăvară	normale — extract	11	0,4/1	3,30
		13	,,	4,19
		15	,,	4,24
	normale — suc vacuolar	11	—	5,87
		13	—	6,87
		15	—	6,60

stată că peroxidaza este localizată atît în sucul vacuolar, cît şi în restul celulei. Spre deosebire de plantulele recoltate după 5 zile de germinare, la care activitatea maximă se află în sucul vacuolar, la frunze găsim o localizare a peroxidazei în special în restul celulei (citoplasmă), ca în cazul frunzelor de porumb.

Frunzele etiolate, în funcţie de lotul cercetat, prezintă o activitate peroxidazică variabilă, aproximativ de acelaşi ordin de mărime cu aceea a frunzelor normale, iar în ceea ce priveşte repartizarea în sucul vacuolar sau în restul celulei, diferenţa remarcată la frunzele normale este diminuată. Ambele soiuri de grîu se comportă asemănător; din tabela 3 re-

zultă că grîul de primăvară are în general o activitate mai mare decît cel de toamnă. Parish [12] a observat o micşorare a activităţii peroxidazice la separarea electroforetică în gel de amidon a peroxidazei din coleoptile şi din primele frunze de grîu crescute la întuneric. Acest fapt se poate datora fie comportării unui soi anumit, fie condiţiilor de mediu în care s-au dezvoltat plantele, deoarece acestea duc la variaţii foarte mari în activitatea enzimei.

Separarea electroforetică a izoperoxidazelor. La electroforeza în gel de agar, extractul proteic brut din seminţele celor două soiuri de grîu luate în studiu evidenţiază 7 fracţiuni, din care 2 spre anod şi 5 spre catod. Dintre acestea, două fracţiuni din partea catodică a plăcii sînt slab reprezentate (fig. 1*a*).

Urmărind aspectul electroforetic al formelor moleculare ale peroxidazei din plantula de grîu, după 2 şi 5 zile de germinare se constată prezenţa a 11 fracţiuni, din care 5 spre anod şi 6 spre catod, ca după 8 zile de germinare prima fracţiune dinspre anod să nu se mai evidenţieze (fig. 2).

Există o concordanţă între activitatea peroxidazică şi formele moleculare evidenţiate. Creşterea de 2,5—4,5 ori a activităţii în primele 2 zile de germinare este însoţită atît de apariţia de forme moleculare noi, cît şi de intensificarea celor existente. Pînă în ziua a 5-a avem o uşoară intensificare a activităţii pe baza aceloraşi forme peroxidazice, pentru ca în ziua a 8-a, cînd prima fracţiune puternic electronegativă nu se mai observă electroforetic, să se constate aceeaşi activitate sau chiar o uşoară diminuare a ei. În ziua a 5-a de germinare coleoptilul evidenţiază 11 fracţiuni, din care 5 spre anod şi 6 spre catod, pe cînd rădăcinile evidenţiază 9 fracţiuni, din care 4 spre anod şi 5 spre catod (fig. 2). Se remarcă un număr mai mare de fracţiuni în coleoptil faţă de cele ale rădăcinilor, cu toate că activitatea peroxidazică este mai mică în coleoptil decît în rădăcini. Dacă admitem că diferite forme moleculare ale enzimei prezintă caracteristici proprii metabolismului din organul respectiv, aceasta ar arăta deci un metabolism mai complex în coleoptil faţă de rădăcini; Jaaska şi Jaaska [5] afirmă că ar fi diferenţe între enzimogramele peroxidazelor din rădăcini şi coleoptile, dar nu specifică în ce constau acestea.

Sucul vacuolar al plantulei după 5 zile de germinare prezintă acelaşi tablou al fracţiunilor peroxidazice ca şi extractul.

Restul seminţei (endospermul şi scutelul) după 2 zile de germinare evidenţiază 10 fracţiuni, din care 4 în zona anodică şi 6 în cea catodică a plăcii. La 5 zile de la germinare numărul fracţiunilor dinspre anod rămîne acelaşi, pe cînd cele dinspre catod cresc la 7, aspect care se regăseşte şi după 8 zile de germinare (fig. 1 *b*, *c*). Ambele soiuri de grîu cercetate se comportă asemănător.

Comparînd activitatea peroxidazică şi formele moleculare din restul seminţei, după 2 zile de germinare constatăm că activitatea totală este de acelaşi ordin de mărime sau chiar mai mică decît a seminţei negerminate, pe cînd formele moleculare prezintă o diversificare accentuată. Asistăm deci la diversificarea unor molecule de peroxidază în cadrul aceleiaşi activităţi totale, fapt care ne sugerează că aceste modificări sînt fie formări sau disocieri de complecşi, fie polimerizări sau depoli-

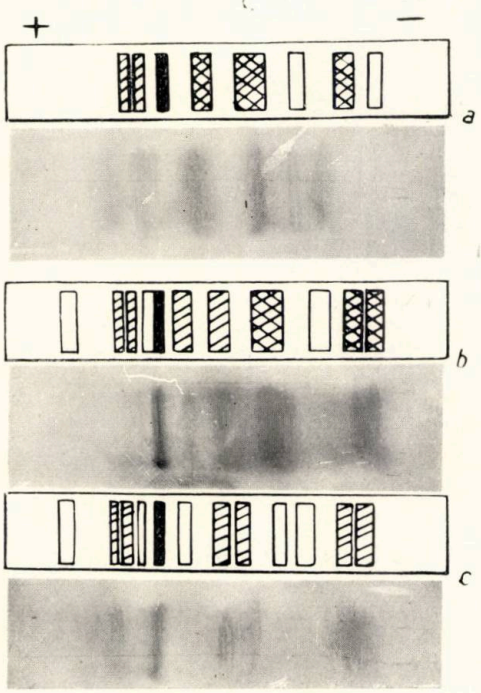


Fig. 1. — Enzimograma obținută în gel de agar în soluție tampon acid boric-borax, pH 8,2, pentru izoperoxidazele din sămînța și restul seminței de grîu în cursul germinării.

a — Sămînță negerminată; *b* — Restul seminței după două zile de germinare; *c* — Restul seminței după cinci zile de germinare.

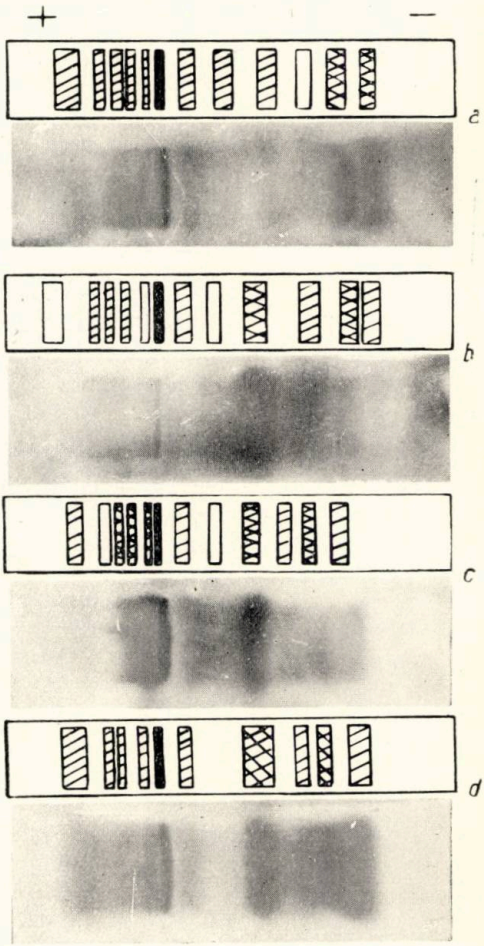


Fig. 2. — Enzimograma obținută în gel de agar în soluție tampon acid boric-borax, pH 8,2, pentru izoperoxidazele din plantula de grîu și diferite organe ale ei în cursul germinării.

a — Plantulă după două zile de germinare; *b* — plantulă după cinci zile de germinare; *c* — coleoptil după cinci zile de germinare; *d* — rădăcină după cinci zile de germinare.

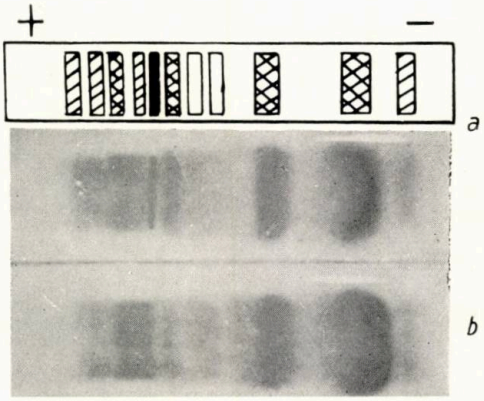


Fig. 3. — Enzimograma obținută în gel de agar în soluție tampon acid boric-borax, pH 8,2, pentru izoperoxidazele din frunzele de grîu după 15 zile de germinare.

a — Extract; *b* — suc vacuolar.

merizări. Creşterea activităţii în următoarele 3 zile se datoreşte atît apariţiei unei noi fracţiuni, cît mai ales intensificării activităţii formelor existente, proces care continuă pînă în a 8-a zi.

Frunzele de grîu recoltate la 11, 13 şi 15 zile de la semănare evidenţiază 11 fracţiuni peroxidazice, 5 spre anod şi 6 spre catod, pentru toată perioada cercetată. Sucul vacuolar respectiv conţine aceleaşi fracţiuni (fig. 3).

Comparînd enzimogramele obţinute din coleoptil cu cele din frunze, se constată acelaşi număr de fracţiuni, dar o distribuţie diferită pe enzimograme (fig. 2 şi 3). Date fiind diferenţele constatate între enzimograma frunzei verzi şi a coleoptilelor etiolate, ne-am propus să comparăm aceste enzimograme cu cea a frunzelor etiolate. Se constată o asemănare între enzimograma frunzei etiolate cu a celor verzi, ceea ce demonstrează că spectrul lor este tipic de organ. Nu apar deosebiri între soiurile de grîu cercetate.

Constatarea noastră că soiurile de grîu de toamnă şi de primăvară cercetate conţin aceleaşi forme moleculare ale peroxidazei este în concordanţă cu rezultatele publicate de Petrocenko şi Kolesnikov [10], care evidenţiază aceleaşi forme moleculare pentru peroxidază la grîul crescut timp de 3 săptămîni la 6 sau la 20°C. De asemenea, Jaaska [4] nu a găsit fracţiuni peroxidazice genom-specifice în cazul soiurilor de grîu diploide, tetraploide şi hexaploide.

Ţinînd seama de prezenţa în gelul de agar a curentului de electroendosmoză, formele moleculare ale peroxidazei, evidenţiate de noi în lucrarea de faţă, sînt electronegative faţă de migrarea amidonului, cu excepţia ultimelor două fracţiuni în cazul plantulei, coleoptilului, rădăcinilor şi frunzelor. Pentru sămînţă şi restul seminţei după germinare, ultima fracţiune este electropozitivă, iar penultima se situează pe linia startului (electroneutră în condiţiile noastre de lucru).

CONCLUZII

1. Activitatea peroxidazică la grîu este apreciabilă şi creşte continuu în perioada germinării, atît în plantulă, cît şi în restul seminţei. În perioada vegetativă ea este scăzută în coleoptil şi în primele frunze şi de 2—3 ori mai mare în rădăcini.

2. Peroxidaza din grîu este foarte eterogenă din punctul de vedere al sarcinii electrice globale, evidenţiindu-se sub forma a 7—11 fracţiuni.

3. În toată perioada cercetată, formele moleculare evidenţiate sînt în majoritate electronegative şi doar două sînt electropozitive.

4. Apariţia noilor forme moleculare enzimatic active are loc cu sau fără modificarea activităţii totale.

5. Soiurile de grîu de toamnă şi de primăvară cercetate sînt asemănătoare atît din punctul de vedere al dinamicii peroxidazei, cît şi al evoluţiei formelor moleculare evidenţiate în primele 15 zile de creştere.

Prezentat la redacţie
la 20 ianuarie 1970

Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. B. Hagihara, K. Tagawa, I. Morikawa, M. Shin, K. Okunuki, Nature, **181**, 1588 (1958).
2. K. Tagawa, M. Shin, K. Okunuki, Nature, **183**, 111 (1959).
3. G. A. Lanzani, A. Marchesini, E. Galante, L. A. Manzocchi, P. Sequi, Enzymol. Acta Biocatal., **33** 361 (1967).
4. V. Jaaska, Izvestia Akademii Nauk Estonskoi SSR, Biologia, **18**, 170 (1969).
5. V. Jaaska, V. Jaaska, Izvestia Akademii Nauk Estonskoi SSR, Biologia, **17**, 164 (1968).
6. D. W. A. Roberts, Canad. J. Bot., **47**, 263 (1969).
7. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969, p. 237.
8. I. Hagima-Călin, St. cerc. biochim., **13**, *1*, 47 (1970).
9. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **7**, *2* (1970).
10. E. I. Petrocenko, P. A. Kolesnikov, Biohimia, **31**, 1117 (1966).
11. G. A. Lanzani, E. Galante, Arch. Biochem. Biophys., **106**, 20 (1964).
12. R. W. Parish, Austr. J. biol. Sci. **22**, 261 (1969).

WHEAT PEROXIDASE DURING THE FIRST DEVELOPING STAGES

SUMMARY

Peroxidase activity in wheat is considerable and it increases continuously during the germination period both in seedlings and in the rest of the seed. In the green period the activity is low in the coleoptil and the first leaves and 2—3 fold higher in roots.

Wheat peroxidase presents a high heterogeneity from the point of view of the overall electric charge, and was evinced as 7—11 fractions. During the investigated period the molecular forms evinced are mainly electronegative and only two electropositive. The appearance of new enzymatically active molecular forms takes place with or without any modification of the overall activity.

The autumn and spring wheat inbreds investigated are similar from the point of view of the enzyme dynamics, as well as of the evolution of the molecular forms evinced in the first days of developing stages.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 121–128 (1970)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENȚEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

VII. DIFERENȚIEREA CONȚINUTULUI DE AMINOACIZI, ZAHARURI ȘI SUBSTANȚE AROMATICE, ÎN CORELAȚIE CU REZISTENȚA LA GER

I. BRAD

Rezumat. — Sînt prezentate date în legătură cu diferențierea conținutului de aminoacizi, zaharuri și substanțe aromatice (cromatografic) în corelație cu rezistența la ger, în raport cu nutriția minerală și comparativ între specii și organe diferite. Se constată o ordonare a rezistenței la ger după conținutul de zaharuri. Diferențele sînt mari la plantele nutrite diferențiat. Numai concentrația în zaharuri nu este suficientă pentru explicarea rezistenței la ger. Se constată de asemenea o ordonare inversă între conținutul de aminoacizi liberi și rezistență. Conținutul de prolină și oxiprolină este mai mare în cazul unei rezistențe mai mari. O rezistență la ger mai mare este legată de un conținut mai mic de substanțe de tip ciclic, compuși fenolici în special, hidrosolubili.

Studierea conținutului acestor substanțe cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie a fost puțin aplicată în legătură cu rezistența la ger. Datorită acestui fapt, nu s-a putut ajunge la o concluzie referitor la existența unei corelații între acumularea acestor substanțe, variațiile de temperatură, rezistența la ger și metabolismul global.

Pentru determinarea rolului unor substanțe simple asupra rezistenței la ger, unii autori au folosit metoda indirectă a vacuuminfiltrației. Astfel, Trunova [15] a folosit pentru coleoptilele de secară soluții 0,35 M de diferite zaharuri, cea mai eficace soluție fiind cea de zaharoză. Tumanov și Trunova [16], lucrînd pe plante de toamnă, dovedesc prin cromatografie pe hîrtie că cetozele se acumulează în cantitate mai mare decît aldozele.

În legătură cu rolul conținutului de aminoacizi asupra rezistenței la ger, putem spune că părerile sînt împărțite. Astfel, Blagoveșcenschi [3] consideră că acidul glutamic și asparagina ar avea un rol important în mărirea calității fermenților, fiind „stimulenți biogeni". Heber [9] își exprimă convingerea că aminoacizii nu joacă nici un rol în protejarea plantelor contra frigului.

O altă categorie de substanțe foarte importante, dar în același timp neglijate în biochimia vegetală, în general, și în biochimia rezistenței la ger, în special, sînt substanțele ciclice aromatice. În lucrarea de sinteză a lui Mason [14] sînt prezentate un număr apreciabil dintre aceste sub-

stanţe, care participă la procesele legate de activitatea peroxidazei (donoare de electroni, hidroxilări). Kretovici [10], citînd pe Bach şi Paladin, subliniază importanţa acidului clorogenic în procesele respiratorii ale plantelor. Macovschi [13] insistă asupra rolului important al acestor substanţe şi asupra necesităţii studierii lor. Analiza lor amănunţită pentru cereale nu a fost întreprinsă decît de puţini cercetători, între care citǎm pe Basyouni [2], care a analizat acizii fenolici la grîu, detectînd acizii *p*-cumaric, sinapic, vanilic, siringic, *p*-hidroxibenzoic, 2-hidroxi--3-metoxicinamic şi alţii. Levitt [12] citează autori care, analizînd conţinutul de substanţe tanice şi de antociani la plante, au găsit în cele mai multe cazuri o acumulare mai mare a acestora la plantele mai rezistente. Enikeev [6] subliniază micşorarea conţinutului de auxine şi diminuarea procesului de creştere o dată cu scăderea temperaturii. Konovalov [11] subliniază că giberelina micşorează rezistenţa la ger, prelungind durata de creştere. Baburov [1] afirmă că formarea complecşilor aromatolipoproteici este favorabilă rezistenţei la ger.

Din expunerea materialului documentar rezultă că la noi în ţară astfel de cercetări nu s-au făcut, iar în alte ţări numărul lor este restrîns. În lucrarea de faţă am încercat să găsim unele corelaţii între rezistenţa la ger şi conţinutul în aceste substanţe, comparativ între specii şi organe diferite, ca şi în raport cu nutriţia minerală, pentru interpretarea rezistenţei la ger şi pentru găsirea unor indici de triere.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru efectuarea studiului comparativ s-a lucrat cu speciile, soiurile, organele şi variantele agrotehnice prezentate într-o lucrare anterioară [4].

Determinările cromatografice de zaharuri, aminoacizi şi substanţe aromatice s-au executat pe material vegetal proaspăt, în perioada celor mai scăzute temperaturi din 1961 (minima −10°C). S-au făcut determinări paralele la secară, grîu şi orz, analizîndu-se nodul cu hipocotil şi frunza. Dintre variantele cu nutriţie diferenţiată la orz, s-au analizat variantele $N_3P_1K_1$, $N_1P_3K_1$, $N_1P_1K_3$. Şi în acest caz s-au făcut determinări la nodul cu hipocotil şi la frunză.

Pentru executarea analizelor cromatografice, din materialul mărunţit şi omogenizat s-au cîntărit 10 g şi s-au mojarat cu nisip şi alcool etilic (70%). Proba mojarată a fost adusă la 50 ml cu alcool etilic de aceeaşi concentraţie. După agitare timp de 30 min şi depunere liberă timp de alte 30 min, s-au luat 25 ml din supernatantul clar, s-au adăugat 5 ml apă distilată şi s-a agitat totul cu 90 ml cloroform. După separarea celor două faze, s-a îndepărtat cloroformul conţinînd lipide şi liposolubile. Extractul apos a fost concentrat în etuva de vid la 40—45°C. Reziduurile au fost dizolvate în 2 ml apă. Din această soluţie s-au depus pe hîrtia cromatografică (Whatman 1 sau SS 2043 b) cîte 30 µl pentru fiecare spot la determinarea zaharurilor din frunze şi a aminoacizilor din nod şi cîte 20 µl pentru determinarea zaharurilor din nod şi a aminoacizilor din frunză. Pentru determinarea substanţelor aromatice s-au folosit 30 µl atît pentru nodul cu hipocotil, cît şi pentru frunze, la toate variantele.

Spoturile au fost depuse astfel încît să se găsească la 5 cm față de suprafața lichidului de irigare, procedeu prin care se obține o separare foarte bună. Pentru irigare s-a folosit sistemul Partridge (butanol — acid acetic — apă) 4 : 1 : 5 [7]. După 24 de ore de irigare, cromatogramele au fost uscate în aer liber.

Pentru punerea în evidență a aminoacizilor s-a folosit o soluție de 0,4% ninhidrină în cloroform. După uscare în etuvă la 60°C, pentru fixarea spoturilor, cromatogramele s-au tratat cu o soluție 1% de azotat de cupru în acetonă. Pentru hidrații de carbon s-a folosit reactivul cu 5 g uree în 20 ml acid clorhidric 2 N și 100 ml alcool etilic [7], ca și reactivul cu 1 g *para*-aminofenol, 2 g acid *orto*-fosforic și 50 ml alcool absolut. Reactivul se folosește după filtrare. Pentru compușii fenolici s-a folosit reactivul cu 15% clorură ferică în amestec 1 : 1 cu fericianură de potasiu 1%.

Cromatogramele s-au apreciat vizual, notîndu-se cu 5 intensitatea maximă a spoturilor, sau cu ajutorul densitometrului integrator VEB tip 150. Ca rezultat s-a trecut valoarea evaluată de integrator pentru zona de extindere a spotului. Aceasta se obține scăzînd valoarea citită la integrator la limita inferioară a spotului din valoarea citită la integrator la limita superioară a spotului.

Pentru separarea prin cromatografie pe hîrtie a substanțelor aromatice extrase cu apă s-a făcut în prealabil o blocare rapidă la 100°C a 10 g frunză, s-a mojarat apoi cu nisip și apă distilată și s-a adus la 50 ml. După agitare și filtrare s-au luat 25 ml, care s-au adus la sec în etuva de vid. Reziduul a fost dizolvat în 2 ml apă, din care 30 µl s-au folosit pentru separarea prin cromatografiere, ca și la extracția cu alcool. După uscarea cromatogramei s-a pulverizat cu reactivul cu fericianură și clorură ferică. Spoturile au fost delimitate imediat, făcîndu-se aprecierea vizuală, din cauza rapidei denaturări a cromatogramelor.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Constatările făcute la executarea acestor determinări ne-au dus la unele concluzii care prezintă oarecare interes atît în raport cu unele metode de lucru și folosirea metodei cromatografiei pentru trierea plantelor după rezistență, simultan cu alte procedee, cît și în raport cu metabolismul intermediar legat de mecanismul rezistenței la ger.

Analizînd comparativ conținutul de zaharuri din frunză față de cel din nod (tabela 1), se constată un conținut mai mare de zaharuri în nodul cu hipocotil decît în frunze, diferențele fiind mai mari în special în ceea ce privește zaharoza.

Dacă se analizează comparativ rezultatele obținute la secară, grîu și orz, se constată că, la frunză, conținutul cel mai mare este la secară și cel mai mic la orz, diferențele fiind mai accentuate față de rezultatele prezentate într-o lucrare anterioară [5], în care s-a folosit metoda Hagedorn-Jensen [8]. Deși ne-am fi așteptat ca prin metoda cromatografică să constatăm o aceeași ordonare după conținutul în nodul cu hipocotil, totuși ordonarea nu a rămas aceeași.

Analiza comparativă a rezultatelor obţinute, în funcţie de nutriţia minerală, scoate în evidenţă diferenţe importante, care n-au fost prinse prin metoda Hagedorn-Jensen. Valorile arată o ordonare clară, conţinutul cel mai mare de zaharuri constatîndu-se la varianta cu trei doze de superfosfat şi sare potasică. Diferenţele cele mai frapante privesc

Tabela 1

Conţinutul comparativ de zaharuri solubile din frunza şi nodul cu hipocotil de secară, grîu şi orz neîngrăşat şi îngrăşat cu NPK în diferite proporţii, exprimat în valorile evaluate la integrator pentru spotul corespunzător

Varianta	Frunză						Nod cu hipocotil						Observaţii
Zaharuri solubile	secară	grîu	orz	orz	orz	orz	secară	grîu	orz	orz	orz	orz	
	NPK 000	NPK 000	NPK 000	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 000	NPK 000	NPK 000	NPK 311	NPK 131	NPK 113	
Fructoză	67	57	51	59	54	74	76	79	48	42	36	64	revelări cu
Glucoză	89	110	81	76	84	98	196	150	120	141	193	147	*para*-amino-
Zaharoză	98	66	43	45	63	95	90	103	64	48	61	72	fenol
Total	245	243	175	182	211	237	293	332	232	231	290	283	
Fructoză	14	14	12	8	11	9	28	31	12	12	15	15	revelări cu uree,
Glucoză	30	30	21	14	31	21	40	46	31	27	43	30	acid clor-
Zaharoză	36	30	27	23	20	38	36	40	33	27	28	52	hidric
Total	80	74	50	42	62	68	104	117	76	66	86	97	

conţinutul de zaharoză. Conform cercetărilor noastre, numai prin cromatografie pe hîrtie se poate constata că raportul dizaharide/monozaharide este mai mare în cazul unei rezistenţe mai mari naturale sau induse prin nutriţie diferenţiată. Faptul că deosebirile constatate prin metoda Hagedorn-Jensen între frunzele plantelor de orz nutrite diferenţiat sînt mici sau nule duce la concluzia că la plantele nutrite cu azotat de amoniu se găsesc cantităţi mai mari de substanţe reducătoare, care nu sînt zaharuri şi pot falsifica unele rezultate. Deoarece la varianta cu azotat de amoniu se constată o cantitate mai mare de substanţe aromatice care pot reacţiona cu fericianura în condiţiile noastre de lucru, credem că şi acestea sînt răspunzătoare de neconcordanţa dintre rezultatele obţinute anterior [5] prin metoda Hagedorn-Jensen [8] şi cele obţinute prin metoda cromatografică. N-ar fi exclus să prezinte interes, ca indice de triere, raportul dintre substanţele reducătoare glucidice şi substanţele reducătoare aglucidice.

Analiza rezultatelor obţinute prin cromatografie pe hîrtie la aminoacizi (tabela 2) scoate în evidenţă conţinutul de aminoacizi liberi mult mai mic în nod decît în frunză, în raport cu conţinutul de proteine, care de asemenea este mai mic în nod decît în frunze. Secara, grîul şi orzul se ordonează atît după conţinutul de aminoacizi din frunze, cît şi după conţinutul de aminoacizi din nod, într-o succesiune inversă faţă de rezistenţă. Diferenţele sînt mai mari decît cele constatate la analiza azotului total [5].

Tabela 2

Conținutul comparativ de aminoacizi liberi în frunza și nodul cu hipocotil de secară, grîu și orz neîngrășat și îngrășat cu NPK în diferite proporții, exprimat în valorile evaluate la integrator pentru spotul reprezentînd grupul de aminoacizi enumerați în ordinea descrescătoare R_f-ului

Varianta	Frunză						Nod cu hipocotil					
Aminoacizi liberi	secară	grîu	orz	orz	orz	orz	secară	grîu	orz	orz	orz	orz
	NPK 000	NPK 000	NPK 000	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 000	NPK 000	NPK 000	NPK 311	NPK 131	NPK 113
Leucină, izoleucină, fenilalanină	7	9	16	23	20	14	4	3	8	10	7	3
Valină, metionină, triptofan	12	9	6	14	16	12	4	5	10	10	7	5
Gamma-aminobutiric, tirozină	14	14	22	28	16	7	5	3	8	9	5	4
Prolină	+ 5	+ 4	+ 3	+ 2	+ 4	+ 4	urme					
Alanină, treonină	13	20	21	26	25	16	11	8	15	14	13	5
Oxiprolină	+ 5	+ 4	+ 3	+ 2	+ 4	+ 4	urme					
Acid aspartic, acid glutamic	17	16	34	66	34	48	10	12	17	27	15	21
Serină, glicocol	15	40	36	22	17	13	17	22	21	23	8	5
Histidină, arginină, lizină	33	33	39	39	31	13	19	23	29	23	16	13
Cisteină, cistină	19	18	24	25	16	14	7	12	9	13	17	11
Total	130	159	188	243	176	138	77	88	117	129	88	67

Între variantele agrotehnice diferențierile sînt accentuate, azotatul de amoniu determinînd prezența unei cantități mai mari de aminoacizi liberi. Aceasta se poate datora fie favorizării sintezei aminoacizilor, fie unei activități proteolitice mai puternice, favorizată și de un conținut mai mare de proteină brută.

Constatarea conținutului mic de prolină în nodul cu hipocotil ne surprinde. Ar fi fost de așteptat să se găsească în cantitate mai mare în nod față de cea din frunză, în raport cu diferența de rezistență. La frunză se constată ordonarea rezistenței la ger după conținutul în prolină și oxiprolină. Deși conținutul de aminoacizi liberi este mai mare la varianta cu azotat de amoniu, totuși conținutul cel mai mare de prolină se constată la variantele cu superfosfat și sare potasică. Același fapt se constată și între secară, grîu și orz. La ceilalți aminoacizi nu constatăm regularități. R_f-urile multor aminoacizi fiind foarte apropiate și neputînd calcula raportul dintre diferiți aminoacizi grupați, nu se pot formula alte concluzii în afară de cele enunțate.

Determinările referitoare la substanțele de tip fenolic (tabela 3) ne-au permis să facem presupunerea că diferențele dintre ordonarea după culoare la extracția cu apă și la extracția cu alcool demonstrează descompunerea unor complecși aromatoproteici prin denaturarea lor cu ajutorul alcoolului, denaturare deosebită față de cea realizată prin încălzire. Intensitatea maximă a culorii extractului de secară în cazul mojarării cu alcool credem că dovedește că cele mai multe substanțe aromatice din frunzele de secară se găsesc legate, combinate, spre deosebire de frunza de orz, unde ele se găsesc libere. Probabil că, datorită faptului că în frunza de orz aceste substanțe (cu acțiune fiziologică puternică și

Tabela 3

Variația conținutului de substanțe aromatice în funcție de specie și varianta agrotehnică și modul de extracție (conținutul maxim corespunde notației 5 — apreciere vizuală)

Varianta	Secară	Grîu	Orz	Orz	Orz	Orz	Secară	Grîu	Orz
R_f-ul substanțelor aromatice din spot	NPK 000	NPK 000	NPK 000	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 000	NPK 000	NPK 000
	Extract alcoolic						Extract apos		
0,92	4	2	4	5	4	3	2	1	3
0,82	—	—	3	5	3	2	—	—	—
0,72	5	—	—	—	—	—	2	—	—
0,68	4	1	1	1	1	1	2	1	1
0,64	—	2	—	—	—	—	—	1	—
0,60	3	3	3	3	2	2	2	3	3
0,55	—	2	4	5	4	3	—	1	3
0,50	5	3	4	5	4	3	2	2	4
0,39	—	—	4	5	3	3	—	—	4
0,28	4	3	4	5	3	3	2	—	4
0,23	—	2	—	—	—	—	—	2	—
0,18	4	3	3	4	2	2	2	3	2
0,08	3	2	1	1	1	1	1	2	1
Total	33	23	31	39	26	24	15	17	23

foarte diferite ca efect) se găsesc libere, orzul are un metabolism mai intens, cu atît mai intens în cazul nutriției cu azot. În cazul nutriției cu superfosfat și sare potasică, unele dntre aceste substanțe care stimulează procese nefavorabile rezistenței se sintetizează în cantitate mai mică. În secară aceste substanțe se pare că se sintetizează în cantitate mai mare, însă ele nu se găsesc libere, ci sînt legate, deci neutralizate ca efect fiziologic. De aceea credem că secara nu crește în timpul iernii și are un metabolism scăzut, fiind probabil libere într-o cantitate mai mare substanțele care stimulează procesele favorabile rezistenței.

Printre substanțele de tip fenolic se găsesc cîteva care par a fi specifice, ca, de exemplu, le secară, pentru $R_f = 0{,}72$, la grîu $R_f = 0{,}13$ și la orz $R_f = 0{,}39$ și 0,82.

Considerăm că sînt de perspectivă separarea acestor substanțe, determinarea influenței lor asupra activității enzimelor, determinarea structurii lor, sinteza și folosirea pentru dirijarea metabolismului.

CONCLUZII

Metoda cromatografică permite să se constate o mai mare diferență în conținutul de zaharuri al diferitelor variante și o mult mai clară ordonare a rezistenței la ger după conținutul de zaharuri. Conținutul de zaharoză evidențiază diferențele cele mai mari, mai ales între plantele de orz nutrite diferențiat. În nodul cu hipocotil de grîu se constată un conținut mai mare de glucide decît la secară. Aceasta impune găsirea altor explicații ale rezistenței la ger decît cele legate de concentrația simplă în zaharuri.

Cromatografia pe hîrtie permite să se constate o ordonare inversă între conținutul de aminoacizi liberi și rezistență, diferențele fiind mult mai mari decît cele constatate la determinarea proteinei brute. Conținutul de prolină și oxiprolină este mai mare în cazul unei rezistențe mai mari, atît în funcție de specie, cît și în funcție de nutriția minerală.

O rezistență la ger mai mare este legată de un conținut mai mic de substanțe de tip fenolic solubile libere. În cazul măririi rezistenței la ger cu ajutorul nutriției minerale diferențiate, se provoacă la orz sinteza într-o cantitate mai mică a substanțelor de tip fenolic la îngrășarea cu doze mai mari de superfosfat și sare potasică și sinteza într-o cantitate mai mare a acelorași substanțe la nutrirea cu cantități mai mari de azotat de amoniu. La secară, conținutul total de substanțe de tip fenolic (extrase în alcool) este mai mare; totuși, rezistența mare presupunem că se datorește faptului că aceste substanțe sînt combinate ca heteroproteide de tip aromatoproteic.

Prezentat la redacție
la 2 iunie 1967

Secția de fiziologie,
I.C.C.P.T., Fundulea-București

BIBLIOGRAFIE

1. Baburov A., Oknina E. I., Fiz. Rast., **7**, 591 (1960).
2. Basyouni S. El., Towers G.H.N., Canad. J. Biochem., **42**, 493 (1964).
3. Blagoveșcenschi A. V., *Bazele biochimice ale procesului de evoluție la plante*, Edit. agrosilvică de stat, București, 1953.
4. Brad I., St. cerc. biochim., **8**, 163 (1965).
5. Brad I., St. cerc. biochim., **10**, 189 (1967).
6. Enikeev H. X., *Biologhiceskie osobennosti slivi i vivedenie novih sortov*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1962.
7. Hais I. M., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960.
8. Hagedorn G., Jensen H., Biochem. Z., **137**, 46 (1923).
9. Heber U., Planta, **52**, 431 (1958).
10. Kretovici V. L., *Bazele biochimiei plantelor*, Edit. Academiei, ISRS, București, 1960.
11. Konovalov I. N., Lerman P. I., Mihaleva B. N., Smetannikova A. I., în *Fiziologhia ustoicivosti rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1960.
12. Levitt J., *The hardiness of plants*, Academic Press, New York, 1956.
13. Macovschi E., comunicare personală.
14. Mason N. S., Advanc. Enzymol., **19**, 70 (1957).
15. Trunova T. I., în *Fiziologhia ustoicivosti rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1960.
16. Tumanov I. I., Trunova T. I., Fiz. Rast., **4**, 397 (1957).

CONTRIBUTIONS TO THE BIOCHEMICAL STUDY OF AUTUMN CEREAL FROST RESISTANCE. VII. DIFFERENTIATION OF AMINO ACID CARBOHYDRATE AND AROMATIC SUBSTANCE CONTENT AS RELATED TO FROST RESISTANCE

SUMMARY

The paper presents data about the chromatographically determined differentiation of amino acid, carbohydrate and aromatic substance content in correlation with frost resistance and mineral nutrition and comparatively, between different species and organs.

An order of frost resistance was found, according to the carbohydrate content. Differences are greater in plants with differential nutrition. Carbohydrate concentration does not constitute a sufficient explanation for frost resistance.

A reversal order between frost resistance and free aminoacid content is also evident. The higher the proline and oxiproline content the higher the frost resistance.

A higher frost resistance is correlated with a smaller content of cyclic substances, especially of phenolic water soluble compounds.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 129–134 (1970)

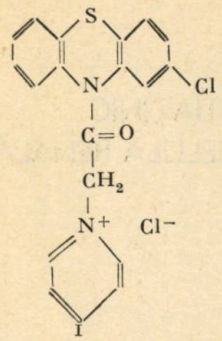
EFECTUL UNUI COMPUS PIRIDINIUIL-FENOTIAZINIC ASUPRA TRANSPORTULUI ACTIV DE SODIU ÎN CELULA RENALĂ

O. DREICHLINGER şi G. DEUTSCH

Rezumat. — A fost urmărit efectul clorurii de 1-[2′—(2″-clorfenotiazinil-10″)-2′-oxoetil]-piridiniu asupra fluxului unidirecţional de sodiu (eflux) în ţesutul renal (măsurat cu $^{24}NaCl$) şi asupra consumului de oxigen (determinat *in vitro*, în aparatul Warburg); a fost determinată de asemenea şi acumularea tisulară a compusului. S-au constatat în prezenţa substanţei testate o inhibare de 40,5% a efluxului de sodiu din compartimentul intracelular lent schimbabil şi o creştere a conţinutului de sodiu în ambele compartimente intracelulare (lent şi rapid). După preincubare s-a observat o mărire a activităţii relative a sodiului tisular faţă de martor. Compusul urmărit se acumulează în ţesutul renal.

Este cunoscut rolul ATP-azei Na^+ şi K^+ dependente în asigurarea sursei energetice a transportului celular activ al sodiului [1]. Sistemul enzimatic a fost pus în evidenţă în diverse ţesuturi, respectiv celule: hematii [2], rinichi [3], muşchi [4], ţesut nervos [5], ficat [6], fiind remarcat în mod special în ţesutul nervos şi în cel cu funcţii secretorii [7]. Pe de altă parte, au fost evidenţiaţi numeroşi inhibitori ai enzimei, ca glicozidele cardiace [8], *p*-clormercuribenzoatul, 2,4-dinitrofluorbenzenul, N-etilmaleinimida [9], oligomicina [10], atebrina, clorpromazina [11], mercaptomerina şi meralluridul [12].

Avînd în vedere importanţa reabsorbţiei sodiului din urina primitivă [13], care este un proces activ, ni s-a părut utilă sinteza unor substanţe inhibitoare ale ATP-azei $Na^+—K^+$ dependente din ţesutul renal. Pentru a asigura o activitate eficientă în acest ţesut, am considerat raţional ca, pe lîngă componenta inhibitoare a enzimei, substanţa sintetizată să conţină şi o grupare despre care se cunoaşte că este activ transportată către interiorul celulei renale. O astfel de grupare poate fi aceea cuaternară de piridiniu, reprezentantul tipic fiind N-metilnicotilnicotinamida [14]. Substanţele sintetizate pe baza principiului formulat mai sus au deci o moleculă ce poate fi considerată „mixtă", fiind constituită, pe de o parte, dintr-o componentă inhibitoare a ATP-azei (2-clorfenotiazina cu o catenă de 2 atomi de carbon la azot, prin similitudine cu clorpromazina) şi, pe de altă parte, o componentă care determină pătrunderea substanţei în celula renală (gruparea cuaternară de piridiniu) [15], [16].



În lucrarea de față sînt redate rezultatele privind acțiunea inhibitoare a clorurii de 1-[2′-(2″-clorfenotiazinil-10″)-2′-oxoetil]-piridiniu (I) asupra transportului activ de sodiu din țesutul renal. Sinteza seriei de substanțe de acest fel este descrisă în altă parte [16].

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate *in vitro*, pe felii de țesut renal cortical, de șobolan adult, introduse într-un mediu salin tamponat, care conținea 5% ser de viței [17]. Fluxul unidirecțional de sodiu a fost determinat în stare staționară (după Kleinzeller, Janacek și Knotkova [18]), la 25,5°C, cu ajutorul $^{24}NaCl$; calculul cineticii fluxului de Na a fost efectuat după Solomon [19], conform modelului paralel. S-a măsurat activitatea relativă a ^{24}Na cu ajutorul unui contor cu scintilație și al unui numărător în decade Vakutronik, într-o instalație cu geometrie fixă. Determinările de sodiu au fost făcute la un fotometru cu flacără Zeiss (model III), sodiul tisular fiind determinat după Lear[20]. Au fost efectuate experiențe atît în condiții martor, cît și în prezența substanței testate, în concentrație de 5 mM.

Pe lîngă determinarea fluxului de sodiu, a fost urmărită și acumularea substanței testate în feliile de țesut, prin determinarea indicelui de acumulare (exprimat ca raportul dintre concentrația substanței din țesut și concentrația substanței din mediu). Determinarea compusului fenotiazinic s-a făcut la un fotometru Zeiss (model V.S.U.1), la 225 nm.

De asemenea a fost urmărită și influența substanței (I) asupra consumului de oxigen (QO_2 exprimat în µl/mg țesut uscat și oră), în aparatul Warburg [21], în atmosferă de O_2, la 25°C și în mediul indicat mai sus.

REZULTATE

Curbele de eflux de Na sînt redate în figurile 1 și 2.

Ele au fost obținute în felul următor [18]: prin reprezentarea logaritmului activității restante în feliile de țesut, în funcție de timp (considerînd activitatea inițială egală cu 100%), se obține o curbă inițială (valorile găsite experimental). Această curbă reprezintă însumarea a trei procese de eflux de sodiu, și anume efluxul din compartimentele intracelulare „lent" și „rapid" către lichidul interstițial, precum și efluxul de sodiu din lichidul interstițial spre mediul lichid în care au fost plasate feliile de țesut. Separarea grafică a celor trei procese de eflux se face prin extrapolarea porțiunii ascendente drepte a curbei inițiale, pînă la $t = 0$, după care valorile extrapolate se scad, punct cu punct, din partea curbă a acesteia. Se obține astfel o nouă curbă („prima scădere", în figură), a cărei ramură dreaptă descendentă se continuă (extrapolare)

pînă la $t = 0$, şi se repetă operaţia de scădere, obţinîndu-se o a treia dreaptă („a doua scădere", pe figură). Cele trei drepte reprezintă cele trei procese de eflux amintite mai sus. Analiza cineticii efluxului de sodiu are la bază aceste trei drepte.

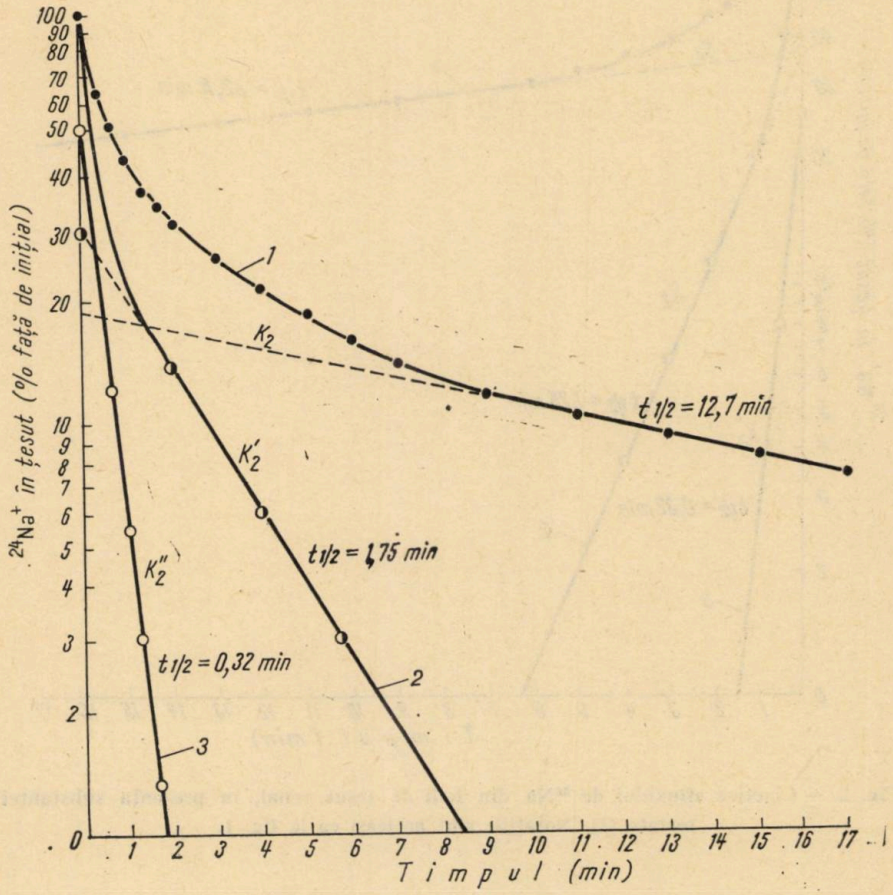


Fig. 1. — Cinetica efluxului de ^{24}Na din felii de ţesut renal, în condiţii martor.

1 — Valori găsite; *2* — valori obţinute după prima scădere; *3* — valori obţinute după a doua scădere; — — — tangenta la curbă.

Rezultatele privind cinetica fluxului unidirecţional (eflux de sodiu) sînt arătate în tabelă.

Din tabelă rezultă că substanţa (I) produce o creştere a compartimentului intracelular lent al sodiului (C_0), de la 19 la 26 %, şi a celui rapid, de la 29 la 37 %, în condiţiile unei scăderi a sodiului extracelular, de la 52 la 37 %. Constanta de eflux (K_2) corespunzătoare compartimentului intracelular lent scade marcat, indicînd un grad de inhibare a transportului de Na cu 40,5 %, faţă de martor, pe cînd în cazul compartimentului rapid variaţia este nesemnificativă. Constanta de eflux corespunzătoare spaţiului

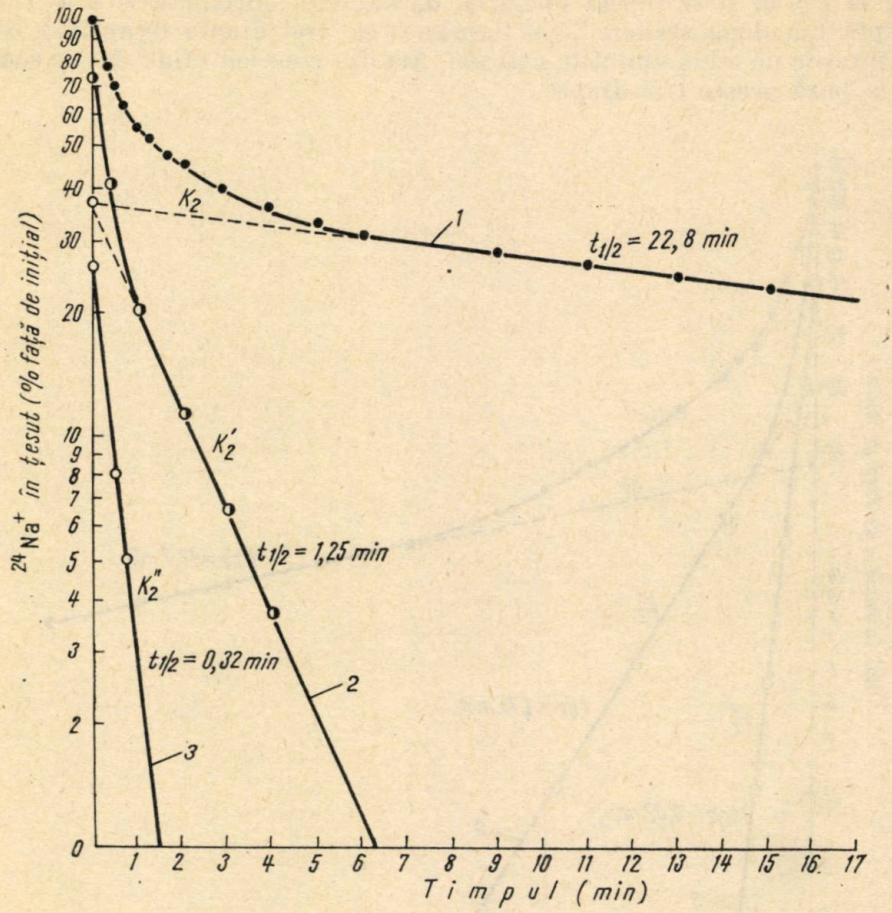


Fig. 2. — Cinetica efluxului de ^{24}Na din felii de țesut renal, în prezența substanței testate (I). Notațiile sînt aceleași ca la fig. 1.

Compartimentul de sodiu	Condiții	C_0 (%)	Na_c (mEq/kg țesut uscat)	K^2 (min^{-1})
Intracelular lent	martor	19	57,5	0,054
	cu inhibitor	26	93,8	0,032
Intracelular rapid	martor	29	87,5	0,397
	cu inhibitor	37	133	0,552
Extracelular	martor	52	156,2	2,16
	cu inhibitor	37	133	2,16

extracelular este neschimbată. Cantitatea de sodiu (Na_e în mEq/kg ţesut uscat) din ambele compartimente celulare creşte, în timp ce în compartimentul extracelular ea scade uşor. Indicele de acumulare a substanţei (I) în ţesutul renal, exprimat, conform celor arătate anterior, ca medie aritmetică $\pm$ eroarea standard a mediei ($n = 6$), după 30 min de incubare, este $6,7 \pm 0,45$. Valorile găsite pentru consumul de oxigen al feliilor de rinichi au fost $6,8 \pm 0,30$ în condiţii martor şi $6,2 \pm 0,37$ în prezenţa substanţei (I); după 45 min de incubare, activitatea relativă a ^{24}Na în ţesutul renal a fost $1,33 \times 10^5$ impulsuri/min·g ţinut în condiţii martor şi $1,89 \times 10^5$ în prezenţa substanţei testate.

DISCUŢII

Compusul testat se acumulează în celula renală, probabil prin mecanismul de transport al substanţelor bazice, de tipul N-metilnicotinamidei [14]. Consumul de oxigen al ţesutului renal, uşor scăzut, poate fi pus în legătură cauzală cu reducerea constatată a transportului de Na, în concordanţă cu cele cunoscute în acest sens [22], [23]. Variaţiile constantei de eflux indică o inhibare de 40,5% a efluxului de sodiu din compartimentul intracelular lent, care, cel puţin în parte [24], reprezintă sodiul transportat activ.

În condiţiile stării staţionare, în care influxul (pasiv) de sodiu nu este afectat, creşterea cantităţii de sodiu în prezenţa substanţei (I) în compartimentele intracelulare, precum şi creşterea activităţii relative a ^{24}Na în ţesut la 45 min de incubare pledează pentru inhibarea transportului activ de sodiu.

CONCLUZII

Din cele de mai sus rezultă că substanţa testată (I):

— este acumulată în ţesutul renal;

— inhibă *in vitro* transportul renal activ de sodiu, ceea ce se evidenţiază net în privinţa efluxului de Na din compartimentul intracelular lent, care scade în proporţie de 40, 5%.

Prezentat la redacţie
la 23 noiembrie 1968

Disciplina de biochimie clinică,
Laboratorul de radioizotopi,
Institutul de medicină — Timişoara

BIBLIOGRAFIE

1. J. C. Skou, Physiol. Rev., **45**, 596 (1965).
2. R. L. Post, C. R. Merrit, C. R. Kinsolving, C. D. Albright, J. biol. Chem., **235**, 1796 (1960).
3. C. R. Kinsolving, R. L. Post, Physiologist, **3**, 94 (1960).
4. J. V. Auditore, L. Murray, Arch. Biochem. Biophys., **99**, 372 (1962).
5. W. N. Aldridge, Biochem. J., **83**, 527 (1962).
6. P. Emmelot, C. J. Bos, Biochim. biophys. Acta, **58**, 374 (1962).

7. S. L. Bonting, K. A. Simon, N. M. Hawkins, Arch. Biochem. Biophys., **95**, 416 (1961).
8. I. M. Glynn, J. Physiol. (Lond.), **136**, 148 (1957).
9. J. C. Skou, Biochim. biophys. Res. Comm., **10**, 79 (1963).
10. I. M. Glynn, Biochem. J., **84**, 75P (1962).
11. J. Järnefelt, Biochim. biophys. Acta, **59**, 643 (1962).
12. E. J. Landon, J. L. Norris, Biochim. biophys. Acta, **71**, 266 (1963).
13. R. F. Pitts, R. S. Alexander, Amer. J. Physiol., **144**, 239 (1945).
14. I. Sperber, Kgl. Lantbuks, Hogskl. Ann., **16**, 49 (1948), citat în *Molecular Pharmacologie*, sub red. E. I. Ariens, Academic Press, New York—Londra, 1965, part. I, p. 38.
15. O. Dreichlinger, G. Deutsch, *Principiu de vectorizare în transportul celular renal al unor substanțe organice*, comunicare la Sesiunea Subcomisiei de biochimie a Academiei Republicii Socialiste România, Timișoara, 12 iunie 1968.
16. O. Dreichlinger, *Sinteza unor substanțe cu acțiune asupra metabolismului rinichiului*, teză de doctorat, Institutul politehnic Timișoara, 1968.
17. B. M. Burg, J. Orloff, Amer. J. Physiol., **203**, 327 (1962).
18. A. Kleinzeller, J. Janacek, A. Knotkova, Biochim. biophys. Acta, **59**, 239 (1961).
19. A. K. Solomon, în *Mineral Metabolism*, sub red. C. F. Comar și F. Bronner, Academic Press, New York, 1960, vol. I, part. A, p. 119.
20. A. Lear, Biochem. J., **62**, 241 (1956).
21. W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, ed. a IV-a, Burgess Publishing Comp., Minneapolis, 1964.
22. U. V. Lassen, J. H. Thaysen, Biochim. biophys. Acta, **47**, 616 (1961).
23. K. I. Ullrich, Pflügers Arch. ges. Physiol., **267**, 207 (1958).
24. J. A.Zadunaisky, P. F. Curran, Amer. J. Physiol., **205**, 949 (1963).

EFFECT OF A PHENOTHIAZINE—PYRIDINIUM COMPOUND ON THE ACTIVE TRANSPORT OF NATRIUM IN THE KIDNEY CELL

SUMMARY

The effect of 1-/2′-(2″-chlorophenothiazinyl-10″)-2′-oxo-ethyl/-pyridinium chloride upon sodium efflux in rat kidney (measured by means of $^{24}NaCl$) and oxygen uptake (determined *in vitro* in the Warburg apparatus) were followed; the tissue accumulation of the compound was also determined.

The test substance inhibits the Na efflux from the "slow" cellular compartment by 40.5% and increases the Na content both in the "slow" and the "fast" intracellular compartments. After preincubation an increase in the tissular sodium relative activity was found as compared to controls. The substance accumulates in the kidney.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 135–144, (1970)

CATABOLIZAREA IMUNOGLOBULINEI G DE CĂTRE UNELE FORMAȚIUNI SUBCELULARE BOGATE ÎN LIZOZOMI, IZOLATE DIN FICATUL DE ȘOBOLAN

V. GHEȚIE și CECILIA MOTAȘ

Rezumat. — Din toate formațiunile subcelulare izolate din ficatul de șobolan, formațiunile lizozomale și mitocondriale au cea mai mare activitate proteolitică, dovedind că în ele se concentrează cea mai mare parte din activitatea cateptică a celulei. Incubînd IgG de iepure cu cele două formațiuni, se obțin fragmente de hidroliză de tip Fab, Fc și Fc′. Numărul și tipul fragmentelor rezultate depind de formațiunea subcelulară utilizată, pH-ul hidrolizei și prezența sau absența cisteinei. La pH 3,5, în prezența cisteinei, fragmentul Fc a fost scindat pînă la fragmentul Fc′ și la unii produși solubili în acid tricloracetic. Fragmentul Fab nu a putut fi hidrolizat nici chiar în prezența unor donatori de energie, ca CoA + + ATP.

Ficatul are capacitatea de a cataboliza imunoglobulina G (IgG) endogenă. Acest fapt a fost demonstrat de Cohen și colab. [1] prin perfuzarea ficatului de șobolan cu IgG radioactivă. Degradarea ei s-a constatat prin apariția unor produși de hidroliză radioactivi, solubili în acid tricloracetic. S-a putut calcula că ficatului îi revin 30% din cantitatea totală de IgG distrusă în corp. Catabolizarea este îndeplinită, probabil, de celulele hepatice parenchimatoase, și nu de celulele Kupffer. Astfel, Freeman și colab. [2] au arătat că blocarea celulelor Kupffer nu atrage după sine o scădere a catabolizării IgG native. În parenchimul hepatic digestia intracelulară a imunoglobulinelor captate prin endocitoză se realizează, probabil, la nivelul lizozomilor. Coffey și de Duve [3] au demonstrat că lizozomii din ficatul de șobolan au capacitatea de a degrada *in vitro* o serie de proteine și enzime. Astfel, globina denaturată a fost hidrolizată de lizozomi într-o proporție de 70%, eliberînd aminoacizi și peptide, constituite mai ales din dipeptide.

În experiențele anterioare am arătat că IgG poate fi hidrolizată *in vitro* de către formațiuni subcelulare bogate în lizozomi, izolate din: organe care fac sinteza IgG, cum este splina [4]; țesuturi implicate în catabolizarea IgG, cum este mucoasa intestinală [5]; celule care au un rol în prelucrarea antigenelor, cum sînt leucocitele polimorfonucleare [6]. Au fost studiate natura și soarta fragmentelor de hidroliză și s-a ajuns la concluzia că în toate aceste compartimente hidroliza IgG „se oprește" la nivelul fragmentului Fab, purtător al situsului de combinare, în timp

ce fragmentul Fc este, în unele cazuri, degradat parțial (pînă la Fc') sau complet.

Scopul lucrării prezente a fost de a stabili gradul catabolizării IgG la nivelul lizozomilor din ficat, urmărind atît evidențierea fragmentelor mari de hidroliză, rezultate prin scindarea cîtorva legături peptidice, cît și eliberarea aminoacizilor și peptidelor în urma degradării intensive a fragmentelor. S-a ales ficatul fiindcă este un organ despre care se știe cu siguranță că nu sintetizează imunoglobuline [7], dar că participă activ la catabolizarea lor [1], [2].

MATERIAL ȘI METODE

Separarea formațiunilor subcelulare din ficatul de șobolan. Doi sau trei șobolani au fost omorîți prin decapitare ; ficații s-au scos repede, s-au spălat într-o soluție rece de zaharoză 0,25 M, s-au zvîntat, cîntărit și mărunțit cu o foarfecă și s-au omogenizat cu 5 volume de zaharoză 0,25 M, rece, cu un omogenizator Potter. Omogenatul s-a centrifugat succesiv la 940 × g/10 min, 5000 × g/10 min, 21 500 × g/10 min, 27 000 × × g/10 min, 39 000 × g/1 oră și 105 000 × g/2 ore, la 4°C. Depozitele au fost spălate o dată cu zaharoză 0,25 M rece și recentrifugate la turațiile corespunzătoare, apoi s-au suspendat într-un volum minim de apă distilată, s-a determinat concentrația proteică prin metoda Aldridge [8] și s-au ajustat volumele cu tampon sau apă distilată, pînă la concentrația proteică dorită (8—18 mg/ml). Depozitele de la 5 000 × g și 21 500 × g vor fi denumite fracțiuni mitocondriale, respectiv lizozomale.

Determinarea activității cateptice. La 2 ml soluție de hemoglobină denaturată (1,5g%) se adaugă 0,5 ml tampon citrat 0,1 M, pH 3,5, și 0,5 ml soluție de analizat. După o incubare de 30 min la 37°C, se adaugă 5 ml acid tricloracetic 10%. După filtrare se determină extincția la 280 nm, într-o cuvetă cu o grosime de strat de 0,5 cm [9].

Prepararea și radioiodurarea IgG de iepure. S-a pornit de la un amestec de seruri de iepure, din care s-a obținut IgG pură prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ la o saturare de 33% și cromatografie pe DEAE-celuloză, cu tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0.

Radioiodurarea s-a făcut prin tehnica oxidării cu azotit [10] în tampon carbonat 0,02 M, pH 9,2, pornind de la o soluție de $Na^{131}I$, fără purtător, avînd o activitate specifică de 15 mCi/ml. S-a adăugat atîta purtător cît să se fixeze aproximativ 6 atomi I/mol IgG. Iodul liber a fost îndepărtat prin filtrare pe Sephadex G—25 ; eluția s-a efectuat cu o soluție de NaCl 0,145 M. Soluția de IgG a avut o activitate specifică de circa 10 μCi/mg proteină și o radioactivitate liberă, neprecipitabilă cu acid tricloracetic (TCA) 10%, mai mică de 1,5%.

Incubarea IgG cu unele formațiuni subcelulare. Amestecul de reacție conține : IgG radioactivă sau neradioactivă 1—2 mg/ml, suspensie din formațiunea subcelulară 4—5 mg proteină/ml, cisteină 0,01 M, EDTA 0,005 M și soluție tampon 0,1 M de pH 2,5—3,5—5,5 (citrat-HCl) sau 7,2 (tris-HCl). În unele cazuri, cisteina și EDTA s-au omis sau au fost

înlocuite prin coenzima A (Koch-Light) 4 mg/ml, glutation redus (Mann) 4 mg/ml, ATP (Koch-Light) 2,14 mg/ml sau acid α-cetoglutaric (Fluka A. G. Brechs) 6 mg/ml, după cum se va indica la rezultate. În aceste cazuri s-a utilizat o suspensie de fracțiune mitocondrială în zaharoză 0,25M.

Formațiunile subcelulare de 21 500 × g au fost uneori utilizate în concentrații de 10, 50 și 100 de ori mai scăzute decît cele indicate mai sus. Pe lîngă suspensiile formațiunilor de 5 000 × g și 21 500 × g s-au folosit și extracte obținute prin 3 înghețări-dezghețări succesive ale acestor formațiuni, suspendate în tampon citrat-HCl 0,1 M, pH 3,5 și centrifugate la 21 500 × g/30 min. Extractele au avut un conținut proteic de aproximativ 10 mg/ml. Hidroliza s-a efectuat la un raport IgG/proteină din extract de 10/2.

După o incubare de 4—16 ore la 37°C, amestecul s-a adus la pH 8,0 cu o soluție de NaOH N și s-a analizat imunoelectroforetic pentru evidențierea fragmentelor de hidroliză.

Dacă s-a urmărit eliberarea ^{131}I, atunci peste amestecul de reacție neutralizat s-a adăugat un volum egal dintr-o soluție de TCA 10% și s-a măsurat radioactivitatea în supernatant. Radioactivitatea neprecipitabilă prin TCA s-a raportat la radioactivitatea totală a amestecului, exprimîndu-se în procente de ^{131}I eliberat din ^{131}I total.

Pentru determinarea prin gel-filtrare a ^{131}I—IgG rămasă nehidrolizată s-au luat cantități de 10 ori mai mari de IgG radioactivă și formațiuni subcelulare la care, uneori, s-au adăugat ca purtător și 50 mg IgG neradioactivă.

În toate cazurile, pentru controlul hidrolizei IgG s-au făcut probe martor, fără formațiuni subcelulare.

Măsurătorile radioactive au fost făcute la un contor de scintilație cu puț și au fost corelate cu valorile găsite pentru incubarea fără formațiuni, deși acestea au fost în general mici [1].

Imunoelectroforeza și gel-filtrarea. Electroforeza a durat 2 ore la un potențial de 6 V/cm, în tampon barbital de pH 8,6, $\mu = 0{,}05$ (în cuvă) și 0,016 (în gel). S-a utilizat un gel de agaroză 1% în plăci de 7/4 cm.

Pentru imunoelectroforeză s-a utilizat un ser de oaie antifragment Fc de iepure, care reacționează cu IgG, Fc și Fc′ și conține de asemenea și anticorpi față de fragmentul Fab. El a fost obținut prin bunăvoința dr. M. Waldesbühl de la Institutul de biochimie din Lausanne. Reacțiile de identificare a unor linii de precipitare s-au făcut cu ajutorul fragmentelor Fab și Fc pure, izolate din hidrolizatele papainice ale IgG prin cromatografie pe CM-celuloză [11].

Gel-filtrarea s-a făcut pe o coloană de Sephadex G—150 eluată cu tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0. S-au colectat fracțiuni de 4—5 ml, în care s-a determinat densitatea optică la 280 nm și s-a măsurat radioactivitatea.

REZULTATE

1. *Activitatea cateptică a formațiunilor subcelulare.* Rezultatele sînt cuprinse în tabela 1.

[2] Măsurătorile au fost efectuate sub controlul lui V. Stănculescu de la Laboratorul de igiena radiațiilor, căruia îi mulțumim și pe această cale.

Formațiunea de 21 500 × g, presupusă a fi cea mai bogată în lizozomi [13], este într-adevăr dotată cu cea mai mare activitate proteolitică; însă, o activitate cu numai 30% mai mică a fost găsită și în fracțiunea de 5 000 × g, presupusă a fi alcătuită mai ales din mitocondrii „grele" [13]. Acest rezultat este concordant cu părerea că populația lizozomală din ficat este eterogenă din punctul de vedere al dimensiunilor

Tabela 1

Activitatea proteolitică a omogenatului și a unor fracțiuni subcelulare izolate din ficatul de șobolan

Fracțiunea	Cantitatea de proteine mg/ml *a*	Activitatea proteolitică $E^{0,5}_{280\ nm}$ *b*	Activitatea specifică *b/a*
Omogenat	15	0,18	0,012
940 × g (nuclei)	15	0,23	0,015
5 000 × g (mitocondrie)	18	0,84	0,047
21 000 × g (lizozomi)	8	0,53	0,066
39 000 × g (vezicule micropinocitare) [12]	9	0,25	0,027
105 000 × g (microzomi)	9	0	0
Supernatant (citoplasmă)	9	0	0

particulelor [14], astfel că o parte din ele — cele mai voluminoase — pot fi depuse împreună cu mitocondriile. În plus, în mitocondrii au fost puse în evidență enzime proteolitice proprii [15], astfel că activitatea fracțiunii de 5 000 × g poate fi pusă și pe socoteala lor.

2. *Gradul scindării moleculelor de IgG în prezența și în absența cisteinei.* Hidroliza IgG cu formațiunea lizozomală de 21 500 × g și fracționarea amestecului prin gel-filtrare pe Sephadex G—150 au evidențiat o fracțiune de IgG catepsin-rezistentă, al cărei procent a variat, în cele trei experiențe efectuate, între 5 și 15% din IgG totală (durata hidrolizei 16 ore). În urma adăugării cisteinei 0,01 M se constată dispariția IgG rezistente la acțiunea catepsinei (fig. 1). Identificarea piscurilor cromatografice s-a făcut prin imunoelectroforeză și prin determinarea volumului de eluție a IgG și fragmentelor Fab și Fc pure. Fragmentul Fc′ nu se separă satisfăcător de amestecul componentelor Fab + Fc.

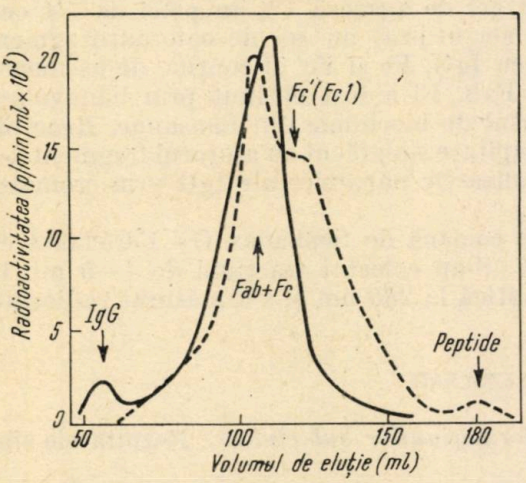


Fig. 1. — Cromatografia hidrolizatului de IgG obținut cu fracțiunea lizozomală în prezența cisteinei (— — —) și în absența cisteinei (—).

În hidrolizatul cu cisteină apare spre sfîrșitul cromatogramei un pisc mic, dar net conturat (2—3%), care poate cuprinde peptide.

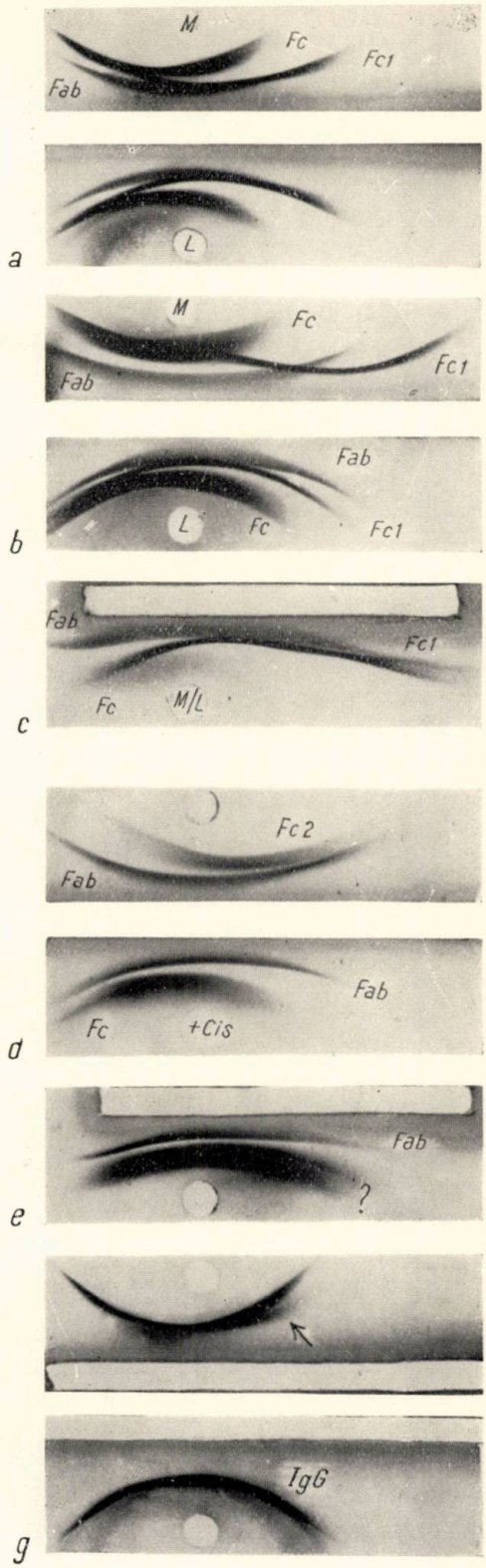


Fig. 2. — Imunoelectroforeza amestecurilor de IgG cu unele fracţiuni subcelulare.

a — Fracţiune mitocondrială şi lizozomală, pH 3,5; *b* — extract din fracţiunea mitocondrială şi lizozomală, pH 3,5; *c* — fracţiune mitocondrială sau lizozomală în prezenţa cisteinei, pH 3,5; *d* — fracţiune mitocondrială, pH 2,5 cu şi fără cisteină; *e* — fracţiune lizozomală în prezenţa cisteinei, pH 2,5; *f* — vezicule micropinocitare sau citoplasmă, pH 3,5; *g* — martor (IgG incubată la pH 2,5 sau 3,5; M — fracţiune mitocondrială; L — fracţiune lizozomală; +cis — s-a adăugat cisteină.

Rezultate similare s-au obținut și prin hidroliza cu fracțiunea mitocondrială de 5 000 × g, cu deosebirea că proporția de IgG rămasă nehidrolizată în absența cisteinei este mai mare (22—35%).

3. *Evidențierea și identificarea fragmentelor de hidroliză ale IgG.* La pH 3,5, fracțiunea mitocondrială scindează IgG la fel ca fracțiunea lizozomală (fig. 2*a*). S-au pus în evidență și s-au identificat fragmentele Fab și Fc, precum și un component notat cu Fc 1, mai sărac în grupări antigenice decît fragmentul Fc, cu care prezintă o reacție de identitate parțială și din a cărui hidroliză mai avansată el rezultă [4]. Componentul Fc 1 este similar cu fragmentul Fc′, format în urma acțiunii papainei asupra IgG de iepure, la pH 5,5 [16], [17]. Linia fragmentului Fc 1 nu se observă la 2 ore de la începerea hidrolizei, apare la 4 ore de la hidroliză și se exprimă net la 12 ore de la hidroliză. Diluînd fracțiunea lizozomală de 10 ori, se constată că se evidențiază numai liniile fragmentelor Fab și Fc; ele se mențin chiar dacă fracțiunea lizozomală se diluează de 100 de ori. Înlocuind suspensiile lizozomale sau mitocondriale cu extractele corespunzătoare, se constată că efectul hidrolitic inițial se menține: se observă liniile fragmentelor Fab, Fc și Fc 1, ultimul fiind plasat cu atît mai aproape de capătul anodic al plăcii, cu cît concentrația proteică a extractului a fost mai mare (fig. 2*b*).

Linia notată cu Fc poate fi dată nu numai de acest fragment, ci și de IgG nehidrolizată, care rămîne în amestec (35% la fracțiunea mitocondrială) și este precipitată de antiserul folosit chiar în regiunea liniei de precipitare.

Prezența cisteinei în hidrolizatele cu fracțiunea mitocondrială sau lizozomală determină, în ambele cazuri, dispariția sau scăderea foarte accentuată a liniei de precipitare corespunzătoare fragmentului Fc. Este de reținut că dispariția fragmentului Fc nu este însoțită de o intensificare a liniei Fc 1, ceea ce înseamnă că în prezența cisteinei hidroliza unei părți din Fc nu se mai oprește la Fc 1, ci poate avansa pînă la fragmente care nu pot fi precipitate. Linia Fc 1 din hidrolizatele cu cisteină nu are o formă și o poziție identică cu cea obținută în hidrolizatele fără cisteină, de aceea ea ar putea corespunde unui component diferit (fig. 2*c*).

La pH 2,5 apar diferențe în modul în care cele două fracțiuni — mitocondrială și lizozomală — hidrolizează IgG. În timp ce fracțiunea lizozomală dă imagini imunoelectroforetice identice cu cele de la pH 3,5, fracțiunea mitocondrială dă numai două linii de precipitare (fig. 2*d*); una a fost identificată cu fragmentul Fab, iar cealaltă, notată Fc 2, are o mobilitate electroforetică intermediară între Fc și Fc 1. Între liniile Fc și Fc 2 s-au realizat fuzionări complete, în timp ce față de Fc 1 linia Fc 2 prezintă un mic pinten. Adăugarea cisteinei determină apariția liniei Fc, ca și cum acest tratament ar determina o trecere a fragmentului Fc 2 în Fc (fig. 2*d*).

Prezența cisteinei în hidrolizatul cu fracțiunea lizozomală determină o schimbare notabilă a imunoelectroforegramei: în locul liniilor Fc și Fc 1 se obțin două linii suprapuse, cu o mobilitate electroforetică apropiată de aceea a fragmentului Fc 2 (fig. 2*e*). Nu s-a făcut identificarea acestor linii.

Incubînd IgG cu fracțiunile mitocondriale și lizozomale la pH 8,0, nu s-a constatat eliberarea fragmentelor; linia de precipitare a IgG a rămas nemodificată.

Fracțiunile de 39 000 × g (vezicule micropinocitare), 105 000 × g (microzomi) și „supernatant" (citoplasmă) n-au avut asupra IgG nici un efect hidrolitic notabil, detectabil prin imunoelectroforeză, nici la pH 3,5 și nici la cel alcalin (8,0). Veziculele micropinocitare și citoplasma, la pH 3,5, au produs în unele cazuri apariția unei linii de precipitare foarte slabe, pornită din linia IgG și așezată spre capătul anodic al plăcii. Diagrama prezintă efectul de „linie scindată" (*split-line*), semnalat în preparatele conservate de IgG [18] (fig. 2*g*). Pentru a elimina suspiciunea că efectele constatate s-ar fi datorat prezenței unor urme de plasmină [19], s-au făcut experiențe de control cu enzima pură, care au exclus implicarea ei în reacție.

În toate experiențele efectuate, linia Fab a rămas nemodificată; supunînd fragmentul Fab acțiunii fracțiunilor lizozomale și mitocondriale, nu s-a obținut nici un efect hidrolitic, linia de precipitare menținîndu-și neschimbate forma și poziția inițială.

4. *Eliberarea ^{131}I prin hidroliza IgG radioactive.* Rezultatele obținute sînt cuprinse în tabela 2.

Tabela 2

Eliberarea produșilor radioactivi, solubili în TCA, prin incubarea ^{131}I–IgG cu suspensii din fracțiunea mitocondrială sau lizozomală *

pH-ul hidrolizei	Fracțiunea mitocondrială		Fracțiunea lizozomală	
	fără cisteină	cu cisteină	fără cisteină	cu cisteină
2,5	4,9	11,7	5,7	16,3
3,5	11,8	18,3	25,4	30,5
5,5	3,6	6,5	4,5	8,4
7,2	1,1	3,0	2,8	2,8

* Rezultatele s-au exprimat în procente de ^{131}I eliberat (solubil în TCA) din radioactivitatea totală a amestecului, considerată 100%. Valorile reprezintă media a 3 serii de experiențe. Concentrația fracțiunilor subcelulare a fost de 4–5 mg proteină/ml. Concentrația IgG radioactive a variat între 1,0 și 1,3 mg/ml. Concentrația cisteinei 0,01 M. Timp de incubare 16 ore, la 37°C.

Considerînd procentul de ^{131}I eliberat ca o măsură a degradării avansate a moleculei de IgG, se poate admite că cea mai mare acțiune distructivă o prezintă fracțiunea lizozomală, la pH 3,5, în prezența cisteinei. Deoarece în aceste condiții de lucru toate moleculele de IgG sînt desfăcute în fragmente (fig. 1), rezultă că valorile determinate pot măsura mărimea porțiunilor din moleculă care suferă o degradare mai avansată. Astfel, fragmentul Fc, degradat de fracțiunea lizozomală în prezența cisteinei, la pH 3,5 (fig. 2), reprezintă 33% din molecula de IgG [11], valoare care se potrivește destul de bine cu procentul de IgG complet degradat (30,5%). În ciuda apropierii dintre aceste două valori, procentul de ^{131}I eliberat este numai proporțional, și nu egal, cu mărimea fragmentului molecular complet degradat, deoarece ^{131}I nu este uniform distribuit pe întreaga moleculă de IgG. Hidroliza cu papaină a IgG radioactive la pH 3,5, la care nu mai rămîn intacte decît fragmentele Fab [20], eliberează 53% din radioactivitatea totală, deși se distruge fragmentul Fc, care reprezintă

numai 33% din IgG [21]. Această comportare arată că procentul de 30,5% ^{131}I eliberat nu dă seama decît de o parte din Fc hidrolizat pînă la produşi solubili în TCA, cealaltă parte rămînînd într-o formă încă precipitabilă cu TCA. De fapt, din figura 2 se poate observa că în urma hidrolizei IgG cu fracţiunea lizozomală, la pH 3,5, cu cisteină, se mai păstrează fragmentul Fc 1, care rezultă prin hidroliza mai avansată a fragmentului Fc.

Deci pe fragmentul Fc se fixează mai mult ^{131}I decît pe fragmentul Fab şi de aceea la hidroliză se eliberează mai mult radioiod decît ar fi de aşteptat dacă distribuţia izotopului ar fi uniformă. De notat că această concluzie nu este în acord cu datele lui Stelos şi colab. [22], care au arătat că pe fragmentul Fab se fixează mai mult ^{131}I decît pe Fc.

5. *Influenţa cofactorilor asupra degradării ^{131}I—IgG de către fracţiunea mitocondrială.* S-a studiat efectul separat şi concomitent al unor substanţe considerate că stimulează catabolizarea albuminei radioactive de către preparatele mitocondriale [23], [24]. Rezultatele sînt înfăţişate în tabela 3.

Se observă că numai GSH are un uşor efect de stimulare a hidrolizei, datorită probabil grupării sulfhidrilice pe care o conţine. CoA, ATP şi α—KG au exercitat, contrar aşteptărilor, un efect inhibitor, ultimul anulînd orice eliberare de ^{131}I. Analiza imunoelectroforetică a unora din aceste amestecuri a arătat că, chiar în cazul sistemului GSH +ATP+α—KG, care nu eliberează ^{131}I, se pun în evidenţă fragmentele de hidroliză Fab, Fc şi Fc 1, care apar şi în absenţa acestor cofactori.

Tabela 3

Efectul cofactorilor asupra hidrolizei ^{131}I—IgG la pH 3,5 de către fracţiunea mitocondrială

Tratament	Radioactivitate eliberată * %
—	100
Cisteină	130
GSH	112
ATP	58
α — KG	0
GSH + ATP	98
GSH + α — KG	0
ATP + α — KG	0
GSH + ATP + α — KG	0
GSH + ATP + + CoA	84

* Radioactivitatea eliberată în absenţa cofactorilor a fost considerată 100%. GSH = glutation redus; α — KG = acid α-cetoglutaric. Timp de incubare 12 ore.

DISCUŢII

Hidroliza IgG de către fracţiunile subcelulare cercetate poate fi pusă pe socoteala catepsinelor prezente la acest nivel. În ficat au fost puse în evidenţă catepsinele A, B, C şi D [25], [26], nu însă şi catepsina E. Desfacerea moleculei de IgG în fragmente de tip Fab, Fc şi Fc′ ar putea fi provocată numai de acţiunea unei singure catepsine (probabil D) însă la hidroliza mai avansată a fragmentului Fc nu poate fi exclusă şi participarea celorlalte catepsine (probabil A sau/ şi B). Se poate presupune că hidroliza avansată a IgG se realizează prin intrarea succesivă în acţiune a catepsinelor, într-o ordine dictată de capacitatea lor de a hidroliza IgG intactă sau numai anumite fragmente [27].

Faptul că hidroliza IgG la pH 3,5 este stimulată moderat prin adăugarea de cisteină, arată că ea ar putea activa o catepsină cisteindependentă, cum este catepsina B [26]. Activitatea catepsinei D purificate nu este crescută prin adăugare de cisteină [25], dar o creştere uşoară a activităţii ei se poate totuşi constata în preparatele brute [25], [28],

așa că nu se poate decide în ce măsură creșterea observată se datorește activării catepsinei B sau D.

Hidroliza crescută a ^{131}I—IgG sub influența cisteinei la pH 2,5 rămîne inexplicabilă dacă se consideră că în ficat nu există catepsină E, care are la acest pH optimul ei de activitate. Atît timp cît nu se cunoaște care este acțiunea catepsinelor A și B sub pH 5, nu se poate spune nimic despre eventualul rol activator pe care îl poate exercita cisteina la pH 2,5 sau 3,5 asupra acestor două catepsine. De aceea, trebuie mai degrabă luată în considerare posibilitatea ca cisteina să acționeze asupra substratului (IgG), și nu asupra catepsinelor. Așa cum au sugerat Gergely și colab. [29], s-ar putea ca cisteina, la pH-uri acide, să determine deplierea moleculei de IgG, care să expună legături peptidice noi, apte de a fi degradate de către catepsine.

Adăugarea cisteinei determină nu numai dispariția fracțiunii de IgG catepsin-rezistente (fig. 1), ci și distrugerea acelor molecule de fragment Fc care nu au fost atacate în absența cisteinei (fig. 2). Această „sensibilitate la cisteină" a fragmentului Fc se poate explica fie prin existența a două tipuri de Fc, fie prin intrarea în joc, sub influența cisteinei, a altor catepsine.

Unul din fragmentele care se desprind din Fc a fost notat cu Fc 1 și pare a fi asemănător cu fragmentul Fc′ [4], [16]. Nu se poate spune în prezent dacă fragmentele Fc 1 ce se obțin la pH 2,5 și 3,5, în prezența și în absența cisteinei, sînt identice, cu atît mai mult cu cît s-au înregistrat diferențe în mobilitatea lor electroforetică. Aceste diferențe electroforetice au fost asemănătoare cu acelea care deosebesc fragmentul Fc′, obținut prin hidroliza cu papaină la pH 4,5 (în prezența β-mercaptoetanolului, 50 mM), de fragmentul Pep III′, rezultat din acțiunea pepsinei [30]. Deoarece fragmentul Fc′ diferă de fragmentul Pep III′ la capătul său N-terminal [31], este posibil ca și între fragmentele Fc 1 obținute în diferite condiții de hidroliză cateptică să existe deosebiri similare.

Acțiunea hidrolitică a fracțiunilor lizozomale și mitocondriale din ficat este asemănătoare, dacă nu chiar identică, cu aceea a fracțiunilor subcelulare corespunzătoare din splină [4], [17] și din mucoasa intestinală [5]. Numai fracțiunea lizozomală „granulară" din leucocitele PMN are o acțiune diferită, ea determinînd hidroliza completă a fragmentelor Fc și Fc′ *în absența cisteinei*. Cum „granulele" din leucocitele PMN sînt bogate în catepsină E, este probabil ca aceasta să poată distruge complet atît fragmentul Fc, cît și Fc′.

În toate cazurile, fragmentul Fab se conservă în hidrolizate, ceea ce dovedește că în condițiile noastre de lucru el nu poate fi atacat nici măcar parțial, indiferent de pH-ul sau proveniența fracțiunilor subcelulare. Fragmentul Fab nu a putut fi hidrolizat la pH 3,5 nici în prezența donatorilor de energie, ca CoA, ATP și GSH, care s-au arătat eficienți în cazul catabolizării albuminei serice de către preparatele mitocondriale din ficatul de șobolan [23], [24]. Mai mult, s-a constatat că adăugarea lor scade acțiunea hidrolitică a fracțiunii mitocondriale. Rămîne, de aceea, neclar felul în care se catabolizează fragmentul Fab, purtător al situsurilor active de combinare, la nivelul lizozomilor. Ar fi posibil ca degradarea lui să necesite intervenția unor protein-disulfid-reductaze, a căror prezență

a fost de altfel semnalată în ficat [32], [33] şi care să-l desfacă în lanţ L şi fragment Fd, acestea din urmă fiind apoi apte de a se hidroliza mai avansat sub acţiunea catepsinelor. Intervenţia disulfid-reductazelor ar putea depinde de procesele oxidative de la nivelul mitocondriei [34] şi ar necesita prezenţa *in vitro* şi a altor cofactori decît cei pe care i-am utilizat noi (de exemplu NADH) [33].

Faptul că IgG a suferit un anumit grad de distrucţie sub acţiunea formaţiunilor subcelulare bogate în lizozomi, de diferite provenienţe (splină, mucoasă intestinală, leucocite PMN şi ficat), pare să sugereze că există un tip „difuz" de catabolism şi pentru IgG. McFarlane [35] a sugerat că un astfel de tip „difuz" de catabolism al proteinelor serice poate avea loc în celulele endoteliale prezente în acest ţesut, toate organele avînd capacitatea *virtuală* de a degrada proteinele în prezenţa cofactorilor apropiaţi. Această capacitate rămîne totuşi virtuală pe plan fiziologic, deoarece s-a arătat că captarea şi degradarea IgG obţinute prin „cernere biologică" (*biological screening*) nu pot fi realizate nici chiar de celule implicate în fagocitoză [36]. Deoarece ficatul este apt de a fixa şi degrada IgG „cernută biologic" [37], este posibil ca el să realizeze catabolizarea acesteia prin etape asemănătoare celor observate de noi *in vitro*.

CONCLUZII

Fracţiunile subcelulare bogate în lizozomi (5 000 × g şi 21 500 × g) sînt capabile să scindeze moleculele de IgG în fragmente de tip Fab, Fc şi Fc'. În anumite condiţii experimentale, fragmentul Fc poate fi degradat mai avansat, pînă la nivelul unor produşi solubili în acid tricloracetic.

Acţiunea proteolitică constatată se datoreşte unei catepsine (probabil catepsina D), localizată în aceste fracţiuni subcelulare şi din care poate fi extrasă cu păstrarea activităţii enzimatice.

Prezentat la redacţie
la 25 noiembrie 1969

Sectorul de imunochimie,
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. S. Cohen, A. H. Gordon, C. Matthews, Biochem. J., **82**, 997 (1962).
2. T. Freeman, A. H. Gordon, J. H. Humphrey, Brit. J. exp. Path., **39**, 459 (1958).
3. J. N. Coffey, C. De Duve, J. biol. Chem., **243**, 3255 (1968).
4. C. Motaş, V. Gheţie, Immunochemistry, **6**, 547 (1969).
5. V. Gheţie, C. Medeşan, Rev. roum. Biochim., **6**, 117 (1969).
6. V. Gheţie, A. Sulica, Immunochemistry, (1969) (sub tipar).
7. L. L. Miller, W. F. Bale, J. exp. Med., **99**, 125 (1954).
8. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
9. R. Gianetto, C. De Duve, Biochem. J., **59**, 433 (1955).
10. A. Johnson, E. D. Day, D. Pressman, J. Immunol., **84**, 253 (1960).
11. R. R. Porter, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
12. J. L. Mego, J. D. Mc Queen, Biochim. biophys. Acta, **111**, 166 (1965).

13. C. De Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Biochem. J., **60**, 604 (1955).
14. Y. E. Rahman, Biochim. biophys. Acta, **146**, 477 (1967).
15. K. Fitzpatrick, R. J. Pennington, Biochem. J., **111**, 298 (1969).
16. V. Gheție, C. Motaș, S. Mihăescu, Rev. roum. Biochim., **6**, 60 (1969).
17. C. Motaș, V. Gheție, St. cerc. biochim., **12**, 69 (1969).
18. F. Škvaril, Nature, **185**, 475 (1960).
19. G. E. Connell, R. H. Painter, Canad. J. Biochem., **44**, 371 (1966).
20. J. Prahl, Biochem. J., **104**, 647 (1967).
21. V. Gheție, date nepublicate.
22. P. Stelos, G. Radzimski, D. Pressman, J. Immunol., **88**, 572 (1962).
23. N. W. Penn, Biochim. biophys. Acta, **53**, 490 (1961).
24. W. L. Beeken, K. Imredy, Biochim. biophys. Acta, **62**, 579 (1962).
25. A. J. Barrett, Biochem. J., **104**, 601 (1967).
26. J. M. W. Bouma, M. Gruber, Biochim. biophys. Acta, **89**, 515 (1964).
27. A. A. Iodice, V. Leong, I. M. Weinstock, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 477 (1966).
28. C. Lapresle, T. Webb, Biochem. J., **84**, 455 (1962).
29. J. Gergely, D. R. Stanworth, R. Jefferis, D. E. Normansell, C. S. Henney, G. I. Pardoe, Immunochemistry, **4**, 101 (1967).
30. V. Gheție, C. Dragomirescu, date nepublicate.
31. M. W. Turner, L. Martensson, J. B. Natvig, H. Bennich, Nature, **221**, 1166 (1966).
32. H. H. Tomizawa, P. T. Varandani, J. biol. Chem., **240**, 3191 (1965).
33. S. Skrede, Biochem. J., **108**, 693 (1968).
34. M. V. Simpson, J. biol. Chem., **201**, 143 (1963).
35. A. S. Mc Farlane, Lancet, **11**, 131 (1963).
36. V. Bocci, L. Masti, A. Pacini, A. Viti, Exp. Cell. Res., **52**, 129 (1968).
37. C. Gheție, S. Mihăescu, date nepublicate.

CATABOLISM OF IMMUNOGLOBULINE G BY SOME LYSOSOME—RICH SUBCELLULAR FRACTIONS ISOLATED FROM RAT LIVER

SUMMARY

Out of rat liver subcellular fractions the lysosomal and mitochondrial one display the highest proteolytic activity, thus showing that cel cathepsin activity is prevailingly concentrated at this level.

By incubating rabbit IgG with these two fractions, Fab-like, Fc-like and Fc′-like hydrolysis fragments were obtained. The number and type of resulting fragments were dependent on the subcellular fraction utilized, the pH of hydrolysis and the presence or absence of cysteine.

At pH 3.5, in the presence of cysteine, the Fc fragment was split into Fc′ fragment and some TCA-soluble products. The Fab fragment could not be digested even in the presence of some energy donors as CoA + ATP.

ST. CERC. BIOCHIM., **13**, *2*, 145–149 (1970)

INFLUENȚA VIRUSURILOR MOZAICULUI CONOPIDEI (VMC) ȘI MOZAICULUI CASTRAVEȚILOR (VMC') ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN AMINOACIZI LIBERI ÎN ANUMITE PLANTE TEST

ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — Plantele de castraveți, conopidă, muștar și varză infectate cu virusurile mozaicului conopidei (VMC) și mozaicului castraveților (VMC') sînt caracterizate prin modificări ale conținutului în aminoacizi liberi începînd cu prima zi de la inoculare. Analizele s-au efectuat în cinci momente ale perioadei de incubație, și anume la 1, 2, 3, 7 și 15 zile de la inoculare pentru castraveți și muștar și, respectiv, la 1, 2, 3, 11 și 23 de zile pentru conopidă și varză, reprezentînd începutul, mijlocul și sfîrșitul perioadei de incubație. Conținutul în aminoacizi liberi este crescut la plantele bolnave în cazul ambelor virusuri. Se observă un număr mare de aminoacizi liberi și modificări intense în cazul virusului mozaicului conopidei. Rezultatele sînt discutate din punctul de vedere al raportului parazit-plantă-gazdă.

Conținutul în aminoacizi liberi poate servi, după cum se știe, ca indice al interacțiunii dintre virus și planta-gazdă.

Datele din literatură se referă numai la modificările induse în conținutul aminoacizilor liberi de către un singur virus pe o gazdă. Bozarth și Diener [1], Commoner și Nehari [2], Charasen [3], Hayashi [4], Karasek [5], Miczynski [6] au urmărit modificările induse în conținutul aminoacizilor liberi în cazul plantelor de tutun infectate cu virusurile mozaicului tutunului (VMT), X și Y ale cartofului și au constatat o creștere în conținutul aminoacizilor liberi la plantele bolnave. Hill [7] a lucrat cu plante de tomate infectate cu virusul „tomato spotted wilt" și a arătat de asemenea stimularea acestora. Diener și Law [8], [9] au constatat variații sezoniere în conținutul aminoacizilor liberi la plantele sănătoase și infectate cu virusuri, în cazul frunzelor de cireș și piersic.

Virusul mozaicului conopidei este limitat numai la plante din fam. *Cruciferae* [10], [11], în timp ce virusul mozaicului castraveților infectează un număr mare de plante dicotiledonate și monocotiledonate.

În cercetările efectuate în vederea lămuririi raporturilor care se stabilesc între virusuri și gazdele lor, ne-am propus un studiu comparativ asupra conținutului în aminoacizi liberi sub influența a două virusuri pe aceleași gazde, precum și a unui singur virus pe mai multe gazde.

În lucrarea de față prezentăm date în legătură cu modificarea conținutului în aminoacizi liberi la plantele de castraveți, conopidă,

muștar și varză, infectate cu virusurile mozaicului conopidei și mozaicului castraveților.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat pe plante de *Cucumis sativus* L. (soiul De Arad), *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. (soiul Erfurt timpuriu), *Brassica oleracea* L. (soiul Licurișca) și *Sinapis alba*.

Experiențele s-au efectuat în cursul perioadei de incubație pe plante crescute în seră, la 18—22°C, lumină 15 ore pe zi, intensitate 6000—8000 lucși, umiditate relativă atmosferică 75—80%.

Inoculările s-au făcut pe cale mecanică, prin frecarea frunzelor cu suc provenit de la plante bolnave. Plantele de conopidă, muștar și varză s-au inoculat în stadiul de două frunze, iar cele de castraveți în stadiul de cotiledoane, adică în momentul optim de infecțiune. Ca martor s-au folosit plante tratate identic cu suc provenit de la plante sănătoase.

Probele s-au luat la 1, 2, 3, 7 și 15 zile de la inoculare la castraveți și muștar și, respectiv, la 1, 2, 3, 11 și 23 de zile la conopidă și varză, reprezentînd începutul, mijlocul și sfîrșitul perioadei de incubație. În aceste probe s-a determinat conținutul în aminoacizi liberi.

Analizele s-au efectuat pe probe medii de la 20 de plante, recoltîndu-se de la fiecare plantă cîte o frunză de la același etaj, folosindu-se 4 g frunze pentru fiecare determinare.

Extracția s-a făcut prin mojararea frunzelor cu apă distilată, iar proteinele s-au precipitat prin tratare cu acetonă clorhidrică 1%. Precipitatul format s-a îndepărtat prin centrifugare la 2000—3000 rotații/minut. Supernatantul apos s-a spălat de 3—4 ori cu eter. Stratul apos s-a evaporat la sec, iar reziduul s-a reluat cu o soluție de amoniac 0,5 N, care s-a aplicat sub formă de spoturi pe hîrtia cromatografică MN 261. S-a folosit ca solvent un amestec de *n*-butanol-acid acetic-apă 4 : 1 : 1 [12], [13]. Migrarea s-a făcut ascendent, timp de 48 de ore. Cromatogramele s-au pulverizat cu ninhidrină 2% în butanol. S-au făcut aprecieri calitative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabelele 1 și 2 sînt arătate modificările produse în conținutul aminoacizilor liberi la plantele de castraveți, conopidă, muștar și varză, sub influența virusului mozaicului conopidei și mozaicului castraveților.

În cazul ambelor virusuri, între plantele bolnave și cele sănătoase apar deosebiri în ceea ce privește natura aminoacizilor liberi.

În cazul plantelor infectate cu virusul mozaicului conopidei apar modificări mai semnificative la 6 aminoacizi liberi, și anume la cisteină, lizină, alanină, prolină, tirozină și valină, în timp ce în cazul plantelor infectate cu virusul mozaicului castraveților apar modificări numai la 3 din acești aminoacizi liberi, și anume la cisteină, tirozină și valină. Astfel, la conopidă, în cazul plantelor infectate cu virusul mozaicului conopidei, găsim modificări la 4 aminoacizi liberi, și anume la cisteină, prolină, tirozină și valină, în timp ce în cazul acelorași plante infectate cu virusul

mozaicului castraveților găsim modificări numai la cisteină și la valină. Plantele de muștar, în cazul virusului mozaicului conopidei, arată modificări la cisteină, lizină și alanină, în timp ce în cazul virusului mozaicului castraveților apar modificări numai la tirozină. Plantele de varză, în cazul virusului mozaicului conopidei, arată modificări la cisteină, în

Tabela 1

Modificarea conținutului în aminoacizi liberi sub influența virusului mozaicului conopidei

Aminoacizi	Conopidă								Muștar								Varză	
	1		2		3		11		1		2		3		7		23	
	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B
Cistină	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Cisteină	−	−	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−
Lizină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+
Histidină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicocol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid glutamic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonină	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
Alanină	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
Prolină	−	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Tirozină	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
Metionină	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
Valină	+	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	+
Leucină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1, 2, 3, 7, 11 și 23 = numărul zilelor de la inoculare; S = plante sănătoase; B = plante bolnave; + = aminoacidul este prezent; − = aminoacidul lipsește.

Tabela 2

Modificarea conținutului în aminoacizi liberi sub influența virusului mozaicului castraveților

Aminoacizi	Castraveți		Conopidă						Muștar	
	15		1		2		3		15	
	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B
Cistină	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Cisteină	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+
Lizină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histidină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicocol	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid glutamic	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonină	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prolină	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
Tirozină	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Metionină	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−
Valină	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+
Leucină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1, 2, 3 și 15 = numărul zilelor de la inoculare; S = plante sănătoase; B = plante bolnave; + = aminoacidul este prezent; − = aminoacidul lipsește.

timp ce în cazul virusului mozaicului castraveţilor nu apare nici o modificare.

Reiese că modificările cele mai importante au loc la plantele infectate cu virusul specializat, adică cu virusul mozaicului conopidei, iar dintre aceste plante în primul rînd la conopidă, adică la planta-gazdă tipică naturală.

Modificările care apar în conţinutul aminoacizilor liberi la plantele infectate cu cele două virusuri arată că există o acţiune preponderentă a virusului în interrelaţia virus-gazdă.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obţinute, se pot trage următoarele concluzii:

1) Ambele virusuri, indiferent de gazdele lor, induc modificări semnificative ale conţinutului în aminoacizi liberi, exprimate, în general, prin apariţia în sucul plantelor infectate a unor aminoacizi liberi, care nu se găsesc şi în sucul plantelor sănătoase. Numărul acestor aminoacizi liberi diferă, la o aceeaşi specie de plante, de la un virus la altul.

2) La aceeaşi specie de plante, modificările cele mai ample ale conţinutului aminoacizilor liberi sînt provocate de virusul caracteristic speciei, respectiv familiei. Acest fapt arată că în interacţiunea virus-gazdă este preponderentă acţiunea virusului.

Prezentat la redacţie la
28 noiembrie 1969

Laboratorul de analize biochimice, radiometrice şi electronice, Institutul de biologie, „Tr. Săvulescu"

BIBLIOGRAFIE

1. R. F. Bozarth, T. O. Diener, Virology, **21**, 188 (1963).
2. B. Commoner, V. Nehari, J. gen. Physiol., **36**, 791 (1953).
3. M. Charasen, Biochim. biophys. Acta, **75**, 644 (1963).
4. Y. Hayashi, Virology, **18**, 140 (1962).
5. M. Karasek, Biochim. biophys. Acta, **78**, 644 (1963).
6. K. A. Miczynski, Acta Biol. Cracov., **2**, 23 (1959).
7. T. A. Hill, Ann. appl. Biol., **49**, 601 (1961).
8. T. O. Diener, N. O. Law, Phytopathology, **44**, 486 (1954).
9. T. O. Diener, Phytopathology, **50**, 141 (1960).
10. F. C. Bawden, N. W. Pirie, J. gen. Microbiol., **21**, 438 (1959).
11. T. P. Pirone, S. G. Pound, J. R. Shepherd, Nature, **116**, 656 (1966).
12. R. J. Block, Anal. Chem., **22**, 1327 (1950).
13. J. F. Thompson, C. J. Morris, Anal. Chem., **31**, 1031 (1959).

THE INFLUENCE OF CAULIFLOWER MOSAIC (CIMV) AND CUCUMBER MOSAIC (CMV) VIRUSES ON AMINO ACID CONTENT IN CERTAIN TEST PLANTS

SUMMARY

Cucumber (*Cucumis sativus* L., Arad variety), cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L., Early Erfurt variety), mustard (*Sinapis alba* L.)

and cabbage (*Brassica oleracea* L., Licurişca variety), plants infected with cauliflower mosaic (ClMV) and cucumber mosaic (CMV) viruses are characterized by the modification of amino acid content, already in the first day following inoculation. Analyses were carried out at five moments of the incubation period namely after 1, 2, 3, 7 and 15 days from the inoculation in cucumbers and mustard, and after 1, 2, 3, 11 and 23 days in cauliflower and cabbage, respectively, representing the beginning, the middle and the end of the incubation period.

The amino acid content is increased in host plants indifferently of the virus with which the inoculation was made. A high number of free aminoacids and intense modifications were found in the case of cauliflower mosaic virus.

Results are discussed with respect to parasite-host plant relationships.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 151–154 (1970)

ACTIVITATEA PEROXIDAZICĂ A SUCURILOR OBȚINUTE DIN FRUNZELE DE VARZĂ ȘI PORUMB PREÎNCĂLZITE LA TEMPERATURI DIFERITE

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — Cercetarea activității peroxidazice a sucurilor obținute din frunzele de varză și de porumb preîncălzite la temperaturi diferite ne-a permis să stabilim că biostructura acestor frunze conține peroxidază, că eliberează masiv această enzimă dacă frunzele sînt încălzite la 60°C și că eliberarea peroxidazei biostructurale nu se face totdeauna paralel cu eliberarea apei : la frunzele de varză eliberarea apei începe la 40°C, iar a enzimei la 60°C, pe cînd la frunzele de porumb ambele componente ale biostructurii încep să fie eliberate la 40°C.

Încălzirea plantelor este însoțită de efecte biochimice variate, începînd cu modificări reversibile ale biochimismului vegetal, cu eventuale repercusiuni asupra calității și cantității recoltei, pînă la dereglări nereversibile, care duc la oprirea creșterii și dezvoltării, la necroza țesuturilor și la pieirea plantelor. În toate aceste cazuri, enzimele joacă un rol important. De aceea, activitatea enzimelor în extractele obținute din plante preîncălzite la temperaturi diferite a format obiectul anumitor cercetări, urmărindu-se mai ales aspecte legate de problema rezistenței plantelor la temperaturi ridicate. De exemplu, Altergot [1] a cercetat activitatea peroxidazei, citocromoxidazei și polifenoloxidazei în extractele rădăcinilor aeriene de *Monstera deliciosa* după încălzirea acestora la temperaturi cuprinse între 21 și 70°C, iar Novoselova, Serova și Volghina [2] au urmărit activitatea unor numeroase enzime, inclusiv a peroxidazei, la plantulele de grîu expuse la temperaturi pînă la 53°C etc.

În sucurile stoarse din țesuturi vegetale, preîncălzite la temperaturi diferite și apoi răcite la temperatura ambiantă, activitatea enzimelor nu a fost încă cercetată. Tocmai prin astfel de cercetări s-ar putea obține însă informații cu privire la influența temperaturilor ridicate asupra raporturilor dintre enzimele integrate în materia biostructurată și cele aflate în lichidul intracelular (lichidul vacuolar, soluția intraplasmatică) [3]. Într-adevăr, omorîrea frunzelor prin încălzire la 100°C provoacă destrămarea biostructurii și punerea în libertate a componentelor materiei biostructurate [4]. Prin urmare, în aceste condiții se pun în libertate și enzimele integrate în biostructuri, numai că eliberarea lor nu poate fi constatată experimental, datorită faptului că la această temperatură ridicată ele sînt inactivate. Dacă însă biostructura ar elibera enzime și la temperaturi sub 100°C, la care ele nu sînt inactivate, atunci eliberarea

lor ar putea fi constatată şi urmărită experimental. De fapt, ar fi de aşteptat ca enzimele eliberate din biostructură să treacă în lichidul celular şi deci în sucul care poate fi stors din frunze.

De aceea, în cazul eliberării enzimelor din biostructură, activitatea enzimatică a sucului obţinut din frunzele preîncălzite ar trebui să fie mai mare decît aceea a sucului obţinut din frunzele martor, nepreîncălzite. Astfel, prin determinarea comparativă a activităţii enzimatice a celor două categorii de sucuri obţinute în cadrul experienţelor efectuate la temperaturi diferite, s-ar putea stabili nu numai temperatura la care începe fenomenul eliberării enzimelor biostructurale, dar şi eventualele legături dintre eliberarea enzimelor şi eliberarea altor componente din care este alcătuită biostructura.

Pentru verificarea acestor supoziţii am ales peroxidaza, enzimă care joacă un rol important în respiraţia plantelor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Am lucrat pe frunze de varză albă (*Brassica oleraceea* L. var. *capitata*, D.C.F. *alba*), scoase din căpăţîni, şi pe frunze de plantule de porumb (*Zea mays*) în vîrstă de trei săptămîni, crescute în seră.

Frunzele de varză s-au tăiat de-a lungul nervurii principale, nervura s-a aruncat, jumătăţile din dreapta alcătuind una din probe (proba A), iar jumătăţile din stînga cealaltă probă (proba B). Fiecare probă era de cîte 50 g.

Frunzele de porumb s-au folosit întregi şi din ele s-au alcătuit două probe de cîte 50 g.

Probele A (martor) s-au păstrat timp de o oră la temperatura ambiantă (20—22°C), s-au stors la 150 atm şi astfel s-a obţinut sucul vacuolar (sucul V).

Probele B s-au introdus în vase de sticlă care s-au astupat ermetic şi s-au încălzit în băi marine timp de o oră la temperaturi de 40, 60, 80, respectiv 100°C. După răcire la temperatura ambiantă, frunzele s-au stors în aceleaşi condiţii ca şi cele din probele A. Astfel s-a obţinut sucul mixt (sucul M), alcătuit din sucul vacuolar, la care s-au adăugat apa şi diferitele substanţe hidrosolubile provenite din destrămarea biostructurii.

Stoarcerea frunzelor s-a efectuat cu o presă hidraulică manuală, tip Hafico, model 2 litri, prevăzută cu dispozitivul pentru cantităţi mici de material; presiunea s-a ridicat lent şi s-a menţinut la 150 atm pînă cînd materialul vegetal a încetat să mai cedeze suc.

După măsurarea volumului, sucurile s-au centrifugat, iar activitatea lor peroxidazică s-a determinat după metoda Mihlin şi Bronoviţkaia [5], cu deosebirea că inactivarea enzimei s-a făcut după 15 minute în loc de 2 minute, cum se prevede în metodă. Activitatea peroxidazică a sucurilor s-a determinat la temperatura de $20 \pm 1°C$ şi s-a exprimat în ml soluţie de iod 0,01 N.

REZULTATE

Unele din numeroasele rezultate obţinute sînt prezentate în tabela 1.

Din aceste date rezultă că, atît la frunzele de varză, cît şi la cele de porumb, încălzirea prealabilă timp de o oră la 40°C face să crească cantitatea sucului stors cu aproximativ 25—30% faţă de cantitatea obţinută din frunzele păstrate la temperatura ambiantă. Preîncălzirea la temperaturi mai ridicate (60—80°C) duce la obţinerea unei cantităţi mult mai mari de suc, asemănătoare cu aceea care se obţine după preîncălzirea frunzelor la 100°C (la varză surplusul este de aproximativ 250%, iar la porumb de 100%).

Tabela 1

Cantitatea (ml) şi activitatea peroxidazică la 20°C (ml soluţie de iod n/100) a sucurilor stoarse la 150 atm din cîte 50 g frunze de varză şi de porumb, atît preîncălzite timp de o oră la temperaturi diferite, cît şi nesupuse preîncălzirii

Nr. crt.	Data	Frunze nepreîncălzite (probe A)				Frunze preîncălzite (probe B)			
		t °C	suc ml	activitate peroxidazică		*t* °C	suc ml	activitate peroxidazică	
				1 ml suc	suc total			1 ml suc	suc total
		VARZĂ							
1	11.XII	20	11	4,5	50	40	15	3,2	48
2	13.XII	21	13	4,8	62	60	44	3,6	158
3	12.XII	20	12	5,0	60	80	39	0,3	12
4	14.XII	20	13	4,7	61	100	42	0,0	0
		PORUMB							
1	3.II	21	14	5,6	78	40	18	5,0	90
2	6.II	21	11	6,4	70	60	24	4,9	118
3	8.II	20	13	5,6	73	80	25	0,5	13
4	10.II	21	14	5,4	76	100	24	0,0	0

Rezultă că la temperatura de 40°C biostructura ţesutului foliar de varză şi porumb eliberează o parte din apa pe care o conţine, iar la temperaturi de la 60°C în sus se eliberează aceeaşi cantitate de apă ca şi în cazul omorîrii prin încălzire la 100°C. Aceste rezultate concordă în general cu cele pe care le-am obţinut anterior cercetînd comportarea la temperaturi ridicate a frunzelor de varză albă şi varză roşie [4]. Unele deosebiri se datoresc calităţii plantelor : acum am lucrat pe varză păstrată pînă în decembrie, iar atunci pe varză din octombrie-noiembrie, deci mult mai proaspătă şi mai bogată în apă.

În privinţa activităţii enzimatice se constată că, la sucurile obţinute din frunzele de varză şi porumb preîncălzite la 40°C, activitatea peroxidazică raportată la 1 ml suc este mai slabă decît la sucurile martor. Aceasta se datoreşte, desigur, diluării sucurilor din frunzele preîncălzite, prin apa eliberată din biostructură. Faptul că activitatea peroxidazică raportată la cantitatea totală a acestor sucuri este aproape egală (varză) sau numai cu puţin mai intensă (porumb) decît a sucurilor martor arată

că la 40°C biostructura acestor frunze fie că nu eliberează peroxidaza (varză), fie că o eliberează într-o cantitate redusă (porumb).

În schimb, la sucurile obținute din frunzele preîncălzite la 60°C, activitatea peroxidazică a sucului total depășește cu mult pe aceea a sucurilor martor, chiar dacă, datorită cantității mai mari de apă eliberată din biostructură, activitatea lor peroxidazică raportată la 1 ml suc este mai slabă. Rezultă că la această temperatură biostructura țesutului foliar eliberează nu numai multă apă, ci și o cantitate relativ mare de peroxidază, care trece în lichidul celular și apare apoi în sucul respectiv.

Se înțelege că la temperaturi mai ridicate (80—100°C) biostructura eliberează peroxidaza în cantitate cel puțin egală cu cea eliberată la 60°C, fenomen care este însă mascat datorită inactivării acestei enzime (inactivarea este avansată la 80°C și totală la 100°C).

Prezentat la redacție
la 19 decembrie 1969

Catedra de biochimie,
Facultatea de biologie,
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. V. F. Altergot, Izd. Akad. Nauk SSSR, ser. biol., **1**, 57 (1963).
2. A. N. Novoselova, O. K. Serova, K. P. Volghina, *Fiziologhiceskie mecanizmi reguliații, prisposobleniia i ustoicivosti u rastenii*, Izd. „Nauka", Novosibirsk, 1966, p. 22.
3. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969.
4. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1967).
5. D. M. Mihlin, Z. S. Bronoviţkaia, în A. I. Ermakov, V. V. Arasimovici, M. I. Smirnova-Ikonnikova, I. K. Murri, *Metodi biochimiceskogo issledovania rastenii*, Selskohozizd., Moscova—Leningrad, 1952, p. 65.

PEROXIDASE ACTIVITY OF SAPS OBTAINED FROM CABBAGE AND MAIZE LEAVES, PREHEATED AT DIFFERENT TEMPERATURES

SUMMARY

The study of peroxidase activity in saps obtained from cabbage and maize leaves preheated at different temperatures revealed that biostructure of these leaves contains peroxidase, that it appreciably releases this enzyme on heating at 60°C and that this release is not always accompanied by a parallel water release : in cabbage leaves water release begins at 40°C while enzyme release at 60°C; in maize leaves the release of both biostructure components begins at 40°C.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 155–161 (1970)

PURIFICAREA PARȚIALĂ A CATEPSINEI D DIN FICATUL DE ȘOBOLAN

SILVIA MIHĂESCU

Rezumat. — Prin treceri succesive pe DEAE- și CM-celuloză și Sephadex G—150 s-a obținut un preparat cu activitate cateptică, purificat de 100 de ori față de extractul total de ficat de șobolan. Fracțiunea activă eluată de pe DEAE-celuloză hidrolizează IgG de iepure la fel cu extractele de lizozomi de ficat de șobolan.

Ficatul este unul din locurile principale de catabolizare a imunoglobulinelor. Aproximativ 30% din γ-globulinele din corp sînt hidrolizate de ficat [1] la nivelul lizozomilor. S-a arătat că extracte lizozomale din ficatul de șobolan scindează IgG de iepure în fragmente de tip Fab, Fc și Fc', similare acelora care se obțin prin hidroliza *in vitro* a Ig G cu papaină, la pH 5,5 [2]. Activitatea hidrolitică poate fi atribuită catepsinei D, a cărei prezență a fost semnalată în ficatul de iepure [3], [4].

Scopul acestei lucrări a fost de a izola și purifica catepsina D din ficatul de șobolan și de a încerca dacă acțiunea hidrolitică a enzimei purificate este aceeași cu cea observată la lizozomi și la extractele lizozomale din acest organ. În literatură există lucrări privind purificarea catepsinei D din ficatul de iepure [5] și din splina de șobolan [6] prin cromatografii succesive pe schimbători de ioni de tip DEAE- și CM-celuloză și prin gel-filtrare pe Sephadex. Metoda aplicată în această lucrare se bazează pe rezultatele obținute în lucrările citate și utilizează o succesiune de separări pe DEAE-, CM-celuloză și filtrare pe Sephadex, după indicațiile date de Štefanovič pentru izolarea și purificarea catepsinei D din ficatul de iepure [7].

MATERIAL ȘI METODE

Extracția catepsinei. S-a lucrat după indicațiile date de Štefanovič [7]. 10 g ficat de șobolan s-au mojarat timp de o oră, la rece, cu 5 g nisip și 30 ml soluție de saponină 1% în apă rece, adăugată în porțiuni mici. Omogenatul s-a dializat, la rece 24 de ore, față de tampon fosfat 0,015 M, pH 8,0. S-a centrifugat la 16 000 rot/min și supernatantul s-a trecut pe DEAE-celuloză.

Cromatografia pe DEAE-celuloză. 18—22 ml de supernatant s-au introdus într-o coloană (1,4/23 cm) umplută cu DEAE-celuloză Whatman

şi echilibrată cu tampon fosfat de pH 8,0. După o experienţă preliminară în care s-a folosit un gradient de molaritate alcătuit din şase trepte (0,01—0,05 şi 0,1 M), s-a stabilit ca procedeu standard de lucru eluţia la două molarităţi : 0,015 şi 0,03 M. Fracţiunea de la 0,03 M s-a concentrat prin perevaporare, s-a dializat faţă de tampon fosfat 0,015 M, pH 6,8, şi s-a cromatografiat pe CM-celuloză.

Cromatografia pe CM-celuloză. 20—25 ml soluţie s-au trecut printr-o coloană (1,4/23 cm) umplută cu CM-celuloză Whatman şi echilibrată cu tampon fosfat 0,015 M, pH 6,8. Fracţiunea obţinută la această molaritate s-a concentrat prin perevaporare pînă la 3—4 ml şi s-a filtrat prin Sephadex G—150.

Filtrarea prin Sephadex G-150. S-a folosit o coloană (1,4/90 cm) cu Sephadex G-150. Eluţia s-a făcut cu tampon glicocol (glicocol 0,1 N + + NaCl 0,1 N) — HCl, pH 8,2. Fracţiunea cu activitate cateptică s-a dializat faţă de apă distilată şi s-a concentrat prin perevaporare.

Determinarea activităţii cateptice. În soluţii activitatea catepsinei s-a determinat după Press şi colab. [8]. La 1 ml soluţie de hemoglobină denaturată 1,5% s-au adăugat 0,5 ml tampon citrat (citrat de sodiu + + acid clorhidric) 0,1 M, pH 3,5, şi 0,5 ml soluţie de analizat. După incubare de o oră la 37°C, reacţia s-a oprit cu 2 ml TCA 10%. S-a filtrat şi filtratul s-a citit la 280 nm. La proba martor, cei 0,5 ml de soluţie de analizat s-au adăugat după precipitarea cu TCA.

Activitatea cateptică s-a exprimat ca diferenţa dintre extincţia probei şi a martorului la 280 nm (ΔE_{280}).

Soluţia de hemoglobină denaturată s-a preparat mojarînd 2,5 g hemoglobină cu 100 ml soluţie de acid citric 0,16 M, adăugat în porţiuni mici. Soluţia obţinută s-a ţinut la 37°C o oră, apoi s-a dializat faţă de apă distilată 2—3 zile. Final, soluţia s-a centrifugat şi s-a păstrat la rece. Înainte de folosire s-a diluat 1,5 ml soluţie hemoglobină 2,5% cu 1 ml tampon citrat 0,1 M, pH 3,5, concentraţia în hemoglobină devenind astfel 1,5%.

Determinarea catepsinei pe plăcile de electroforeză s-a făcut după tehnica dată de Uriel şi folosită de Lapresle şi Webb [6]. După electroforeză, plăcile s-au imersat timp de 90 min, la 37°C, în soluţie de substrat, albumină serică umană 2%, în tampon acetat 0,5 M, care conţinea cisteină 5 mM, s-au scos apoi din soluţie şi s-au ţinut la 37°C, în cameră umedă, încă 3 ore. S-au fixat apoi timp de o oră într-un amestec de alcool etilic 50% şi acid acetic 10%, s-au uscat sub filtru şi s-au colorat cu Amidoschwarz. După spălarea colorantului, zonele în care catepsina este prezentă apar ca un spot mai slab colorat.

Determinarea catepsinei pe plăcile de imunoelectroforeză s-a făcut după Weston [9]. După dezvoltarea liniilor de precipitare, plăcile s-au spălat cu NaCl 0,15 M, la rece, 2 zile. După uscare sub filtru, plăcile s-au pus în contact cu plăci proaspete de agaroză, imersate în prealabil timp de 16 ore, la rece, în tampon formiat (formiat de sodiu + acid formic) 0,25 M, pH 3,5, apoi timp de 30 min, la temperatura ambiantă, în soluţie de hemoglobină 0,5 M, tot în tampon formiat, şi spălate bine de excesul de hemoglobină. După 2,5 ore de contact, plăcile s-au dezlipit şi s-au fixat 10 min în amestec de alcool etilic-acid acetic-apă (50 : 5 : 45),

s-au colorat imediat 5 min cu Amidoschwarz și s-au spălat cu acid acetic 3%. În acest caz, linia de precipitare formată cu catepsina apare mai slab colorată decît restul liniilor de precipitare și fondul plăcii.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a efectuat, după Uriel [10], în gel fără agaroză, în sistem orizontal. La prepararea gelului s-a folosit tampon tris-HCl, pH 8,7, iar în cuvă tampon borat (acid boric-NaOH) 0,3 M, pH 8,2. Migrarea a durat 4 ore la 2V/cm și intensitatea maximă a fost de 1 mA/cm.

Electroforeza și imunoelectroforeza s-au făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal-veronal sodic, pH 8,6, $\mu = 0{,}016$ în plăci și 0,05 în cuvă, la un potențial de 6V/cm, cu o intensitate ce n-a depășit 1 mA/cm, timp de 3 ore.

Ca ser imun s-a folosit ser de iepure imunizat cu extract total de ficat de șobolan.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Urmărind repartizarea activității cateptice în fracțiunile obținute la diferite molarități pe DEAE-celuloză, se observă că fracțiunea ce se eluează la 0,03 M are activitatea cateptică cea mai mare (fig. 1).

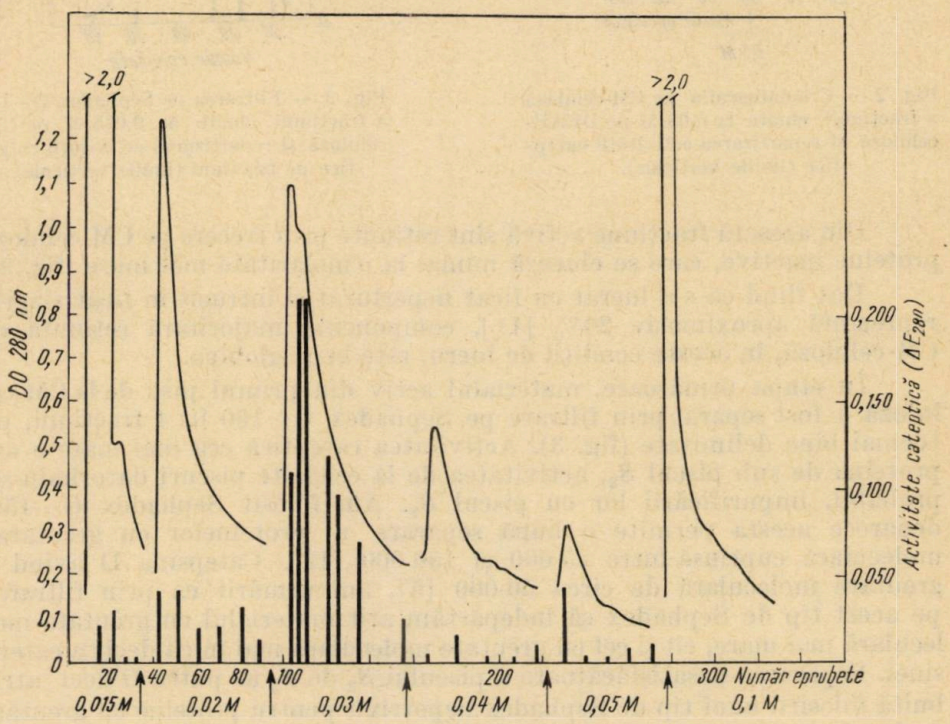


Fig. 1. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a extractului de ficat de șobolan, în gradient de molaritate, și repartizarea activității cateptice pe fracțiunile separate (liniile verticale).

Rezultă că la eluţia cu tampon 0,02 M se îndepărtează o bună parte din proteinele de balast, iar la 0,03 M se obţine o fracţiune bogată în catepsină. Cum în experienţe ulterioare s-a obţinut uneori o activitate cateptică mare chiar la 0,02 M pe ramura descendentă, am stabilit ca protocol de lucru pornirea eluţiei cu tampon 0,015 M şi îndepărtarea fracţiunii respective, păstrîndu-se apoi fracţiunea eluată în continuare cu tampon 0,03 M.

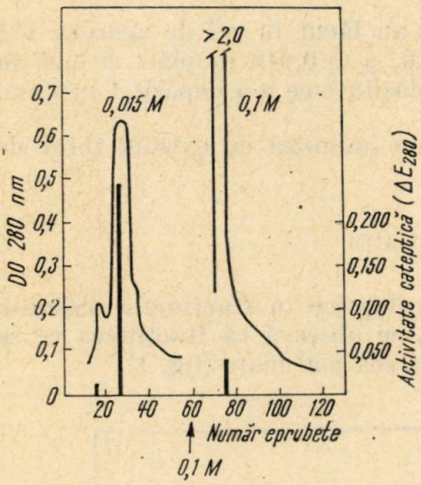


Fig. 2. — Cromatografia pe CM-celuloză a fracţiunii eluate la 0,03 M pe DEAE-celuloză şi repartizarea activităţii cateptice (liniile verticale).

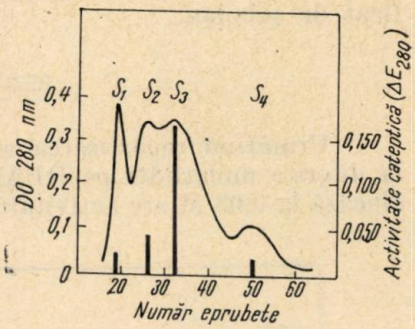


Fig. 3. — Filtrarea pe Sephadex G—150 a fracţiunii eluate la 0,015 M pe CM-celuloză şi repartizarea activităţii cateptice pe fracţiuni (liniile verticale).

Din această fracţiune activă sînt reţinute prin trecere pe CM-celuloză proteine inactive, care se eluează numai la o molaritate mai mare (fig. 2).

Dat fiind că s-a lucrat cu ficat neperfuzat şi întrucît în ficat sîngele reprezintă aproximativ 20% [11], componenta majoritară reţinută de CM-celuloză, în aceste condiţii de lucru, este hemoglobina.

În etapa următoare, materialul activ din primul pisc de la CM-celuloză a fost separat prin filtrare pe Sephadex G—150 în 4 fracţiuni, nu tocmai bine delimitate (fig. 3). Activitatea cateptică cea mai mare o are proteina de sub piscul S_3, activitatea de la celelalte piscuri datorîndu-se, probabil, impurificării lor cu piscul S_3. Am folosit Sephadex G—150, deoarece acesta permite o bună separare a proteinelor cu greutatea moleculară cuprinsă între 25 000 şi 150 000 [12]. Catepsina D avînd o greutate moleculară de circa 50 000 [5], am urmărit ca prin filtrarea pe acest tip de Sephadex să îndepărtăm atît materialul cu greutate moleculară mai mare, cît şi cel cu greutate moleculară mai mică decît a catepsinei. Separarea nesatisfăcătoare a piscului S_2 de S_3 ar putea fi deci atribuită folosirii unui tip de Sephadex nepotrivit pentru proteine cu greutăţi moleculare apropiate. Lapresle şi Webb [6] folosesc Sephadex G—75 ca treaptă finală în purificarea catepsinei D din splină de iepure, dar nu obţin o separare mai bună. Nu este exclus însă ca în cazul nostru

Sephadex G—75 să fie mai eficient, materialul de analizat provenind din alt organ.

După parcurgerea acestor trei etape, făcînd un bilanț al rezultatelor din punctul de vedere al purificării enzimei, se constată că preparatul final are o activitate enzimatică de 100 de ori mai mare decît aceea a extractului inițial (tabela). Două etape sînt importante : DEAE-celuloza,

Tabelă

Purificarea catepsinei D din ficatul de șobolan

Etapa de purificare	Volumul ml	Activitate cateptică ΔE_{280}/ml	Activitate totală	Proteină mg/ml	Activitate specifică ΔE_{280}/mg	Gradul purificării	Randament
Extractul inițial	26	1,05	27,30	57,60	0,018	1	100
DEAE-celuloză	50	0,31	15,50	1,00	0,310	17	57
CM-celuloză	20	0,35	7,00	0,70	0,500	28	26
Sephadex G-150	28	0,13	3,64	0,07	1,850	103	13

care aduce o purificare de 17 ori față de inițial, și gel-filtrarea, care mărește puritatea încă de 5 ori. Deși CM-celuloza nu ridică puritatea preparatului nici măcar la dublu, ea este totuși necesară pentru reținerea hemoglobinei, pe care gel-filtrarea n-ar îndepărta-o, hemoglobina avînd o greutate moleculară apropiată de a catepsinei D.

Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă scoate, de asemenea, în evidență faptul că saltul mare în purificare se face prin cromatografia pe DEAE-celuloză, ca apoi, de la această etapă și pînă la preparatul final, aspectul electroforegramelor să rămînă practic neschimbat (fig. 4).Dife-

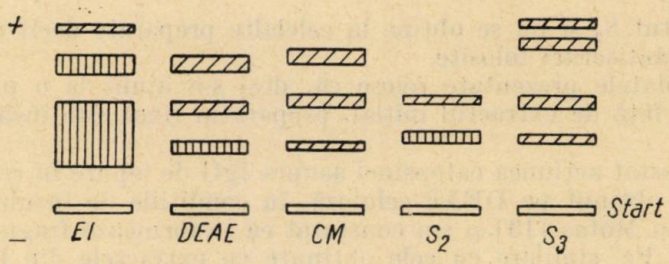


Fig. 4. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă a preparatelor active din diferite etape de purificare a catepsinei D. EI — extractul total de ficat de șobolan înainte de trecere pe DEAE-celuloză; DEAE — fracțiunea eluată de pe DEAE-celuloză cu tampon fosfat 0,03 M, pH 8; CM — fracțiunea eluată de pe CM-celuloză cu tampon fosfat 0,015 M, pH 6,8; S_2 și S_3 — fracțiuni separate prin filtrare pe Sephadex G—150.

rențe apar numai în cadrul aceleiași etape, la filtrarea pe Sephadex, între S_2 și S_3. Dacă atribuim activitatea cateptică mică a fracțiunilor S_1, S_2 și S_4 impurificării lor cu S_3 și cum S_2 prezintă numai două benzi, am putea presupune că activitatea cateptică a fracțiunii S_3 este prinsă de celelalte două benzi, cu mobilitatea mai mare.

Determinînd activitatea catepsinei pe plăcile de electroforeză, se constată că spotul slab colorat nu corespunde nici unei benzi electro-

foretice, ci este plasat între două benzi. Reiese că în preparatul analizat catepsina reprezintă mai puțin de 5%, știut fiind că limita de sensibilitate a electroforezei pentru depistarea componentelor în cantitate mică este în jurul acestei valori.

Urmărind localizarea catepsinei pe imunoelectroforegrame, se observă că activitatea cateptică este localizată pe o linie de precipitare foarte slabă (linia indicată prin săgeată în fig. 5). Această linie lipsește

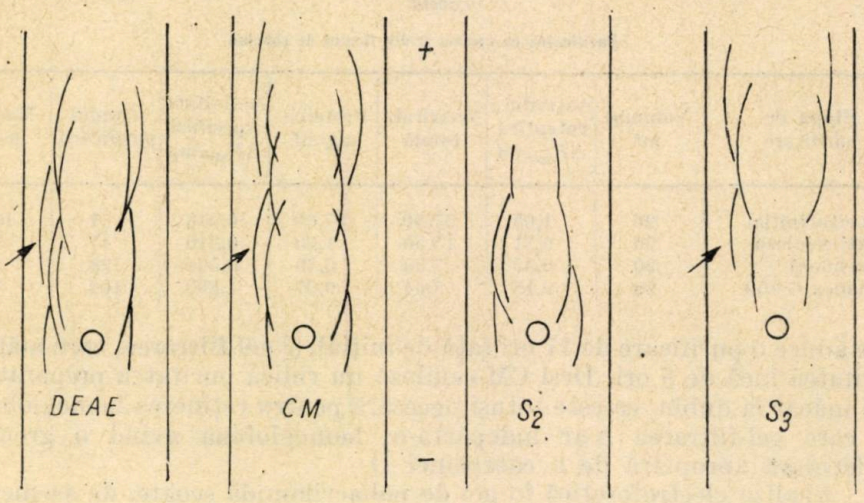


Fig. 5. — Imunoelectroforeza preparatelor active din diferite etape de purificare a catepsinei D. Săgețile indică linia de precipitare dată de catepsina D. Aceeași legendă ca la fig. 4.

la preparatul S_2 și nu se obține la celelalte preparate decît cu unul din cele două antiseruri folosite.

Din datele prezentate reiese că, deși s-a ajuns la o purificare de 100 de ori față de extractul inițial, preparatul final este încă insuficient purificat.

S-a testat acțiunea catepsinei asupra IgG de iepure *in vitro*, folosind preparatul obținut pe DEAE-celuloză, în condițiile de incubare descrise de Gheție și Motaș [13] și s-a constatat că se formează fragmente de tip Fab, Fc și Fc′ similare cu cele obținute cu extractele din lizozomii de ficat de șobolan [13].

CONCLUZII

S-a obținut un preparat cu activitate cateptică mărită prin cromatografii succesive pe DEAE- și CM-celuloză și prin gel-filtrare pe Sephadex G—150.

S-a constatat că preparatul obținut pe DEAE-celuloză este capabil să scindeze IgG, ca și extractele din lizozomi de ficat de șobolan.

Prezentat la redacție
la 29 decembrie 1969

Sectorul de imunochimie,
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. S. Cohen, A. H. Gordon, C. Mathews, Biochem. J., **82**, 997 (1962).
2. C. Motaş, V. Gheţie, St. cerc. biochim., **12**, 69 (1969).
3. O. B. Kusovleva, Wang Chung-Yen, Biohimiia, **24**, 550 (1959).
4. C. De Duve, R. Wattiaux, P. Baudhuin, Advanc. Enzymol., **24**, 291 (1962).
5. A. Barrett, Biochem. J., **104**, 601 (1967).
6. C. Lapresle, T. Webb, Biochem. J., **84**, 455 (1962).
7. J. Štefanovič, comunicare personală dr. C. Motaş.
8. E. M. Press, R. Porter, J. Cebra, Biochem. J., **74**, 501 (1960).
9. P. D. Weston, Immunology, **17**, 421 (1969).
10. J. Uriel, Bull. Soc. Chim. biol., **48**, 969 (1966).
11. R. Depieds, G. Cartouzou, H. Gignoux, C. Cartouzou, C.R. Soc. Biol., **156**, 1444 (1962).
12. K. O. Pedersen, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. I, 157 (1962).
13. V. Gheţie, C. Motaş, St. cerc. biochim., acest număr.

PARTIAL PURIFICATION OF CATHEPSIN D FROM RAT LIVER

ABSTRACT

A 100-fold purified preparation with enzymic activity (cathepsin D) was obtained by successive runnings of a crude preparation of rat liver, through DEAE- and CM-cellulose and Sephadex G—150. The active fraction from DEAE-cellulose breaks down rabbit IgG like the lysosomal extracts from rat liver.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 163–168 (1970)

MUCOPOLIZAHARIDE DIN INTESTINE DE PASĂRE

I. A. MOLNAR, JEANETTE WINTER şi M. SIMIONOVICI

Rezumat. — S-a extras din intestinul subţire de găină un preparat mucopolizaharidic ale cărui proprietăţi fizico-chimice şi farmacodinamice au fost studiate. Prin adăugare de mucopolizaharid la o soluţie de albastru de toluidină, maximul de extincţie se deplasează de la 640 la 600 nm, iar cu exces apare o altă reacţie, cu un maxim la 640 nm. Urmărind raportul de extincţie la 600/640, nm în funcţie de cantitatea de mucopolizaharid, apare un punct de inflexiune. Prin această comportare, mucopolizaharidul din intestinul de găină seamănă cu mucopolizaharidele din tractul intestinal de vită şi de porc şi se diferenţiază de heparină. Activitatea anticoagulantă cercetată faţă de heparină este foarte mică. Acţiunea antilipidică şi cea anticolesterolemică s-au studiat la şobolan faţă de hiperlipidemia tritonică (Triton Serva A–20). Rezultatele arată un efect protector faţă de creşterea densităţii optice a serului, hiperlipidemiei şi hipercolesterolemiei determinate de triton. Proprietăţile de coloraţie cu albastrul de toluidină, acţiunea anticoagulantă redusă şi efectul protector în hiperlipidemia şi hipercolesterolemia experimentală tritonică situează mucopolizaharidul din intestinul subţire de găină în acelaşi grup cu mucopolizaharidele din tractul digestiv de vită şi de porc.

Acţiunea heparinei şi a sulfomucopolizaharidelor acide din tractul intestinal al mamiferelor asupra metabolismului lipidic şi colesterolului a fost studiată de mai mulţi autori. Astfel, Capraro, Cantone şi Cresseri [1], [2] au studiat mucopolizaharidele din mucoasa stomacală de porc, Bianchini [3], [4] a izolat şi a determinat activitatea farmacologică a unui mucopolizaharid din duodenul de bovine şi porcine, iar Molnar şi colab. [5], [6], [7] au studiat conţinutul în mucopolizaharide al ţesuturilor din tractul digestiv la vită şi la porc, proprietăţile lor fizico-chimice şi acţiunea hipolipemiantă şi hipocolesterolemiantă la şobolanul intoxicat cu triton.

În continuarea acestor lucrări, ne-am ocupat cu studiul mucopolizaharidelor din intestinul subţire de găină.

MATERIALE ŞI METODE

Pentru obţinerea unui preparat mucopolizaharidic din intestinul de găină s-a folosit tehnica descrisă anterior [6]. Intestinul subţire s-a curăţat de ţesuturi şi materii străine, s-a congelat la —20°C, apoi s-a tocat fin. 3 kg intestin subţire tocat s-au amestecat cu 9 l apă distilată,

s-a adăugat acid clorhidric pînă la pH 4,5 şi s-a fiert timp de 5 min. S-a adus apoi la pH 6,8 cu hidroxid de sodiu, s-a amestecat timp de o oră la 30°C, apoi s-a adus la pH 8 şi s-a încălzit la 70—90°C, timp de 15 min. S-a acidulat la pH 6,5 şi s-a centrifugat pentru separarea lichidelor. Soluţia apoasă s-a concentrat în vid pînă la 1/4 din volumul iniţial şi s-a dializat faţă de apă curentă la maximum + 5°C, timp de 3 zile. În timpul dializei s-au adăugat fenol şi toluen, pentru conservare. Soluţia dializată, al cărei volum a crescut, s-a concentrat din nou în vid, la 1 l. Pentru eliberarea mucopolizaharidelor din combinaţii, extractul obţinut a fost supus unei hidrolize enzimatice pancreatice, la 35°C, timp de 48 de ore, la pH 7,5—7,8. S-a filtrat şi s-a dializat din nou timp de 2 zile; în acest fel, acizii aminaţi, peptidele cu greutate moleculară mică şi cristaloidele s-au eliminat. Dializatul s-a filtrat şi s-a concentrat în vid la 150 ml; pentru eliminarea proteinelor nedigerate s-au adăugat 56 g soluţie de acid tricloracetic 50% şi s-a centrifugat. Din soluţia obţinută, preparatul mucopolizaharidic s-a precipitat prin adăugarea unui volum de 5 ori mai mare de acetonă. După sedimentare, s-a decantat preparatul mucopolizaharidic gumos, s-a spălat de 4 ori cu acetonă şi s-a uscat în vid. S-au obţinut 10 g. Conţinutul său în mucopolizaharid s-a evaluat prin determinarea conţinutului în acid hexuronic, după Diesche [8].

Determinarea reacţiei metacromatice s-a efectuat cu o soluţie de albastru de toluidină 2×10^{-5} M (0,0061 g/l) şi cu soluţie de preparat mucopolizaharidic de diferite concentraţii în tampon fosfat M/15, la pH 7. La 29 ml soluţie de albastru de toluidină se adaugă 1 ml din soluţia de preparat mucopolizaharidic şi se determină spectrul de absorbţie, la un spectrofotometru, între 500 şi 700 nm. S-au urmărit modificările spectrelor de absorbţie în funcţie de concentraţia mucopolizaharidului. Ele s-au reprezentat grafic prin rapoartele de extincţie ale maximelor observate (600 şi 640 nm).

Determinarea acţiunii antilipidice s-a efectuat după tehnicile descrise într-o lucrare anterioară [5]. Şobolani masculi adulţi, după 24 de ore de post, au fost împărţiţi în trei loturi de cîte maximum 8 animale. Lotul 1 (intoxicaţi) a primit cîte o injecţie intravenoasă dintr-o soluţie 25% de Triton Serva A—20 (polioxietilen-*p*-izoetil-fenol) în apă distilată, în doză de 500 mg/kg corp. Lotul 2 a primit cîte o injecţie de triton în aceleaşi condiţii ca lotul 1, urmată imediat de o injecţie intraperitoneală de mucopolizaharid în doză corespunzătoare la 10 mg acid hexuronic/kg corp. Lotul 3 a fost constituit din animale martore, netratate. Animalele s-au ţinut în continuare la post timp de 18 ore, după care s-au sacrificat pentru prelevarea sîngelui. Sîngele s-a recoltat pe citrat şi s-a centrifugat. În plasmă s-au determinat densitatea optică, lipemia totală şi colesterolemia.

Pentru cele trei serii de determinări s-a calculat efectul protector faţă de hiperlipidemia tritonică, după următoarea formulă:

$$E = 100 - \frac{T - C}{I - C} \times 100,$$

în care E reprezintă efectul protector, în procente, T valoarea medie obţinută la animalele protejate cu mucopolizaharid, C valoarea medie

obţinută la animalele martore, netratate, *I* valoarea medie obţinută la animalele intoxicate cu triton.

Rezultatele obţinute s-au interpretat statistic.

Activitatea anticoagulantă s-a determinat pe plasmă de pisică, în comparaţie cu heparină standard, şi s-a exprimat în unităţi de heparină pe mg mucopolizaharid.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din 1 kg intestin de găină s-au obţinut prin metoda folosită 3,3 g preparat mucopolizaharidic cu un conţinut în acid hexuronic de 2,77%. Mucopolizaharidele în stare pură din tractul intestinal al bovinelor şi porcinelor conţin 34% acid hexuronic. Dacă raportăm conţinutul produsului nostru la această concentraţie, rezultă că 1 kg intestin de găină conţine circa 0,26 g de mucopolizaharid, ceea ce este mai puţin decît conţinutul în mucopolizaharide al intestinului subţire sau al duodenului de bovine sau porcine.

Cu preparatul obţinut s-a efectuat reacţia metacromatică cu albastru de toluidină, folosind diferite concentraţii de mucopolizaharid în probă. La concentraţii relativ mici de mucopolizaharid se observă reacţia metacromatică şi apare o coloraţie violetă; mărind concentraţia de mucopolizaharid, apare o a doua reacţie, coloraţia violetă trecînd progresiv în albastru-verzui. Urmărind spectrofotometric fenomenul observat, se constată că, în funcţie de concentraţia de mucopolizaharid din probă, banda de absorbţie de la 640 nm a albastrului de toluidină dispare progresiv şi apare o altă bandă, cu maximul de extincţie la 600 nm. Urmărind în continuare concentraţia de mucopolizaharid, banda de la 600 nm scade şi apare un alt spectru, cu maximul de extincţie situat la 640 nm, ca la albastrul de toluidină, însă alura curbei este diferită (fig. 1 şi 2).

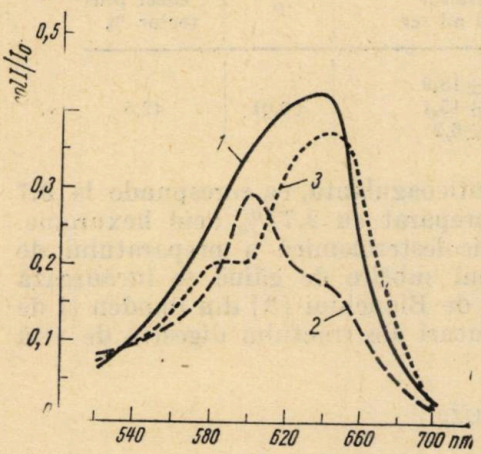


Fig. 1. — Spectrul de absorbţie al albastrului de toluidină (AT) în prezenţa mucopolizaharidului în diferite cantităţi.

1 — AT; *2* — AT şi 3,4 mg MPZ în probă; *3* — AT şi 27 mg MPZ în probă.

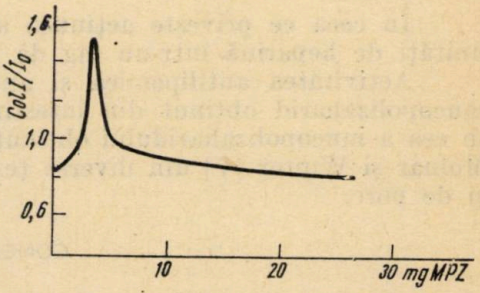


Fig. 2. — Modificările raportului de extincţie la 600/640 nm în funcţie de cantitatea de mucopolizaharid (cu 2,77% acid hexuronic) în probă.

Reacţiile mucopolizaharidului din intestinul subţire de găină sînt asemănătoare cu cele observate la mucopolizaharidele din tractul digestiv de bovine şi porcine. Pentru acestea din urmă este caracteristic maximul de extincţie la 600 nm în prima etapă a reacţiei, ceea ce diferenţiază aceste mucopolizaharide de heparină, la care maximul este situat la 560 nm.

Activitatea antilipemică şi cea hipocolesterolemiantă a preparatului sînt reprezentate în tabelele 1 şi 2.

Tabela 1

Efectul antilipemic al mucopolizaharidului din intestinul de găină

Densitatea optică

Tratament şi nr. de animale		Valoarea extincţiei	*P*	Efect protector %
Triton	8	0,83±0,26		
Triton + MPZ	8	0,46±0,04	<0,01	58,7
Martor	8	0,20±0,03		

Lipemia totală

Tratament şi nr. de animale		Lipide mg/100 ml ser	*P*	Efect protector %
Triton	8	6734±31,0		
Triton + MPZ	7	3801±23,2	<0,01	51,1
Martor	8	994±15,2		

Tabela 2

Efectul anticolesterolemic al mucopolizaharidului din intestinul de găină

Tratament şi nr. de animale		Colesterol mg/100 ml ser	*P*	Efect protector %
Triton	8	314,1±18,9		
Triton + MPZ	8	205,6±15,1	<0,01	42,5
Martor	8	58,5±6,2		

În ceea ce priveşte acţiunea anticoagulantă, ea corespunde la 0,7 unităţi de heparină într-un mg de preparat cu 2,77% acid hexuronic.

Activitatea antilipemică şi anticolesterolemică a preparatului de mucopolizaharid obţinut din intestinul subţire de găină se încadrează în cea a mucopolizaharidului obţinut de Bianchini [3] din duoden şi de Molnar şi Winter [7] din diverse ţesuturi ale tractului digestiv de vită şi de porc.

CONCLUZII

S-au studiat proprietăţile fizico-chimice şi farmacodinamice ale preparatului mucopolizaharidic obţinut din intestinul subţire de găină, comparînd rezultatele cu cele obţinute din tractul digestiv de bovine şi porcine.

Prin reacția de colorație cu albastru de toluidină, în funcție de cantitatea de mucopolizaharid, s-a constatat că colorația se modifică în două etape. În prima etapă apare o bandă cu maximul la 600 nm, iar în a doua etapă la 640 nm.

Banda cu maximul situat la 600 nm, caracteristică pentru mucopolizaharidul din tractul digestiv de vită și de porc, situează preparatul din intestinul de găină în acest grup, care diferă din acest punct de vedere de heparină, la care maximul se situează la 560 nm.

De asemenea, activitatea anticoagulantă redusă situează mucopolizaharidul din intestinul subțire de găină în aceeași categorie de substanțe.

Acest mucopolizaharid influențează metabolismul lipidelor și al colesterolului, avînd o intensă acțiune antilipemică și anticolesterolemiantă la șobolanul cu hiperlipidemie și hipercolesterolemie experimentală tritonică.

Prezentat la redacție
la 7 noiembrie 1969

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

BIBLIOGRAFIE

1. V. Capraro, A. Cantone, A. Cresseri, Bull. Soc. ital. Biol. sper., **30**, 1381 (1954).
2. A. Cresseri, Rac. publ. chim., **2**, 235 (1956).
3. P. Bianchini, Bull. Soc. ital. Biol. sper., **34**, 685 (1958).
4. P. Bianchini, Bull. Soc. ital. Biol. sper., **34**, 688 (1958).
5. I. A. Molnar, M. Simionovici, E. Tucicov, C. M. Georgescu, J. Winter, St. cerc. biochim., **9**, 49 (1966).
6. I. A. Molnar, J. Winter, E. Tucicov, V. Pelloni, N. Uricaru, St. cerc. biochim., **9**, 33 (1966).
7. I. A. Molnar, J. Winter, St. cerc. biochim., **9**, 39 (1966).
8. Z. Diesche, J. biol. Chem., **167**, 189 (1947).

MUCOPOLYSACCHARIDES FROM FOWL INTESTINE

SUMMARY

A mucopolysaccharide preparation was extracted from the small intestine and its physical, chemical and pharmacodynamical properties were studied.

After mucopolysaccharide addition to a toluidine blue solution, the maximum of extinction shifts from 540 to 600 nm, whereas an excess gives rise to a maximum at 600 nm.

By pursuing the extinction ratio at 600/640 nm, depending on the mucopolysaccharide amount, it appears a turning point. Owing to this behaviour, the mucopolysaccharide from hen intestine is similar to those from the intestinal tract of cattle and swine, but is dissimilar to heparine.

The anticoagulant activity with respect to heparine is very low.

The antilipidic and anticholesterolemic activity against the tritonic hyperlipidemia (Triton-Serva A—20) were studied in rats. Results show a protective effect against the optical density increase of serum hyperlipidemia and of hypercholesterolemia as determined by tritone.

Staining properties with toluidine blue, the reduced anticoagulant activity as well as the protective effect in experimental tritonic hyperlipidemia and hypercholesterolemia, place the mucopolysaccharide from hen small intestine in the same group as those of the intestinal tract of cattle and swine.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 169–177 (1970)

DISTRIBUȚIA PROTEAZELOR ÎNTRE FORMAȚIUNILE INTRACELULARE DE FICAT DE ȘOBOLAN

CECILIA MOTAȘ

Rezumat. — S-a studiat distribuția proteazelor pe fracțiunile subcelulare de ficat de șobolan, separate prin centrifugare fracționată la 5 000 g (mitocondrii), 21 000 g (lizozomi) și 105 000 g (microzomi și citoplasma solubilă). Prin această metodă nu s-au obținut formațiuni mitocondriale și lizozomale pure, ci fracțiuni bogate în aceste formațiuni. S-a demonstrat localizarea catepsinelor D și B în mitocondrii și mai ales în lizozomi; catepsina A s-a găsit distribuită sensibil egal între cele două formațiuni. Activitatea specifică ridicată la pH 2,5 atît la mitocondrii, cît și la lizozomi ar putea sugera prezența catepsinei E în ficat. Întrebuințîndu-se hemoglobina ca substrat, s-au relevat proteaze alcaline în mitocondrii și în lizozomi și nu s-au decelat în citoplasma solubilă. S-a discutat posibilitatea ca această activitate specifică alcalină să fie atribuită ribonucleazelor alcaline. Toate enzimele proteolitice au prezentat activități specifice considerabil diferite de la preparat la preparat. S-a discutat atît posibilitatea existenței în celulă a mai multor căi de proteoliză, fiecare predominînd în funcție de proteina hidrolizată, cît și coexistența în aceeași fracțiune a tuturor tipurilor de enzime proteolitice.

Pentru a urmări soarta antigenelor proteice în organism, trebuie să se cunoască atît mecanismul catabolizării proteinelor autologe și eterologe, cît și sistemele enzimatice care participă la acest proces.

Sistemele enzimatice care intervin în catabolizarea proteinelor tisulare s-au împărțit, în mod arbitrar, în endopeptidaze și exopeptidaze [1]. Primul sistem care scindează proteinele tisulare și asupra căruia ne-am îndreptat atenția este grupul enzimelor endopeptidazice, format din catepsine, cu pH optim în jur de 5, proteaze II neutre, cu pH optim în jur de 8, și arilpeptidaze, cu pH optim în jur de 7 [2]. Din grupul catepsinelor fac parte catepsinele A, B, C, D și E, enzime destul de bine studiate, separate în stadii mai mult sau mai puțin înaintate: A [3], B [4], [5], C [6], [7], D [8], [9] și E [10]. Proteazele II alcaline, cu pH optim în jur de 8, formează un sistem enzimatic încă atît de puțin cunoscut, încît existența lui este mai mult contestată decît confirmată, iar încercări de separare s-au făcut pe mușchi [11], pe creier [12] și pe cornee [13].

În ceea ce privește repartiția endopeptidazelor tisulare, se știe că în majoritatea lor catepsinele sînt localizate în mitocondrii și, în special, în lizozomi [14], [15], [16], [17], [18]. Lizozomii, prin conținutul lor ridicat în enzime proteolitice, sînt locul de degradare a constituenților

proteici naturali celulari. Nu se cunoaşte cît de avansată este această degradare, şi nici natura şi soarta produşilor finali de scindare ai fiecărui tip de proteină. Cum intervin sistemele cateptice, care este rolul proteazelor alcaline, sînt arilpeptidazele endo- sau exopeptidaze? Cîţi factori, atîtea necunoscute. În ceea ce priveşte mecanismele catabolizării proteinelor autologe şi eterologe, în lucrări anterioare am demonstrat, *in vitro*, că IgG întrebuinţată ca antigen poate fi hidrolizată de către formaţiuni subcelulare bogate în lizozomi, izolate din splină, organ formator de anticorp [19], şi din ficat, organ care catabolizează IgG autologă [20].

În lucrarea de faţă am determinat pe ficatul de şobolan, prin metode adaptate la mijloacele noastre tehnice şi la necesităţile studiului ulterior imunochimic, activităţile cateptice şi proteazice alcaline la formaţiunile bogate în mitocondrii şi în lizozomi, precum şi la supernatant (citoplasmă liberă de formaţiuni).

MATERIAL ŞI METODE

Separarea formaţiunilor subcelulare din ficatul de şobolan. Şobolanii au fost omorîţi prin decapitare; ficaţii, scoşi rapid, au fost cîntăriţi şi mărunţiţi cu o foarfecă şi s-au omogenizat într-un omogenizator Potter, cu 9 volume de zaharoză rece 0,25 M. Omogenatul s-a centrifugat la 4°C, succesiv, 10 min la 940 g, 10 min la 5 000 g, 20 min la 21 000 g, 30 min la 39 000 g şi o oră la 105 000 g. Depozitele au fost spălate de două ori cu zaharoză rece 0,25 M şi recentrifugate la aceleaşi turaţii. S-au suspendat apoi fie în apă distilată şi s-au îngheţat-dezgheţat de 3 ori, fie în soluţie de zaharoză 0,25%. Suspensiile în apă, îngheţate şi dezgheţate, s-au centrifugat 30 min la 21 000 g. Concentraţia proteică s-a determinat în suspensii prin metoda Aldridge [21], iar în supernatant spectrofotometric, la 280 nm.

Substratele. Pentru catepsina D şi proteazele neutre s-a întrebuinţat hemoglobină 2,5% în acid citric 0,16 M, incubată o oră la 37°C, la pH 2,3. S-a ajustat la pH-ul dorit cu soluţie de NaOH N şi s-a dializat 2—3 zile faţă de apă distilată. S-a adus la 1,5% în momentul întrebuinţării [8].

Serumalbumina bovină 1,7% în acid citric 0,33 M s-a incubat o oră la 37°C, iar pH-ul dorit s-a realizat cu NaOH N [8].

Pentru catepsina A s-a întrebuinţat CBZ-α-glutamil-L-fenilalanina (Koch-Light şi Serva) şi pentru catepsina B benzoil-L-argininamida (Serva).

Determinarea activităţilor enzimatice. Catepsina A [3] s-a determinat în volum final de 1 ml, pH 5,0, cu 0,0152 M substrat (CBZ-α-L-glutamil--L-fenilalanina), 0,04 M tampon fosfat-acid citric, pH 5,0 şi enzimă (suspensii sau supernatante) în concentraţie proteică cunoscută. Proba s-a incubat 2 ore la 37°C. Reacţia s-a oprit cu 1 ml TCA 10%. S-a încălzit 10 min în baia de apă şi s-a centrifugat 15 min la turaţii mici. Din supernatantul diluat 1/5 cu apă s-a luat 1 ml şi s-a adăugat 0,5 ml reactiv cu ninhidrină (metoda Stein şi Moore) [22]. Probele s-au diluat cu 12 ml alcool 50%. Pentru a controla desfacerea spontană a substratului, martorul a fost realizat din substrat în tampon, ţinut 2 ore la 37°C, apoi s-au

adăugat 1 ml TCA 10% și enzimă. Rezultatele s-au exprimat în activitatea specifică (raportul dintre extincția citită la 570 mμ, cuvă 0,5 cm și concentrația proteică în mg/ml a preparatului respectiv).

Catepsina B s-a determinat în vasele din metoda Brown și Duda, la volum final de 1 ml, pH 5,0 cu 0,05 M substrat benzoil-L-argininamidă, 0,1 M tampon citrat, pH 5,0, 0,04 M cisteină și enzimă [23]. Proba s-a incubat o oră la 37°C. S-a adăugat apoi 0,5 ml soluție saturată de K_2CO_3 și s-a înmuiat bagheta rodată în H_2SO_4N. S-a astupat bine, s-a amestecat soluția de K_2CO_3 cu restul soluțiilor din vas, s-a lăsat 2 ore la 25°C să difuzeze amoniacul, apoi s-a spălat bagheta cu 9 ml apă, 0,3 ml soluție Fehling II și 0,1 ml soluție Nessler și s-a adus la 10 ml. S-a citit după 10 min la Pulfrich, cu filtru S 42 [5]. S-au făcut martori separat pentru substrat și separat pentru enzimă. S-a constatat că substratul nu eliberează spontan amoniac, așa că singurul martor a fost amoniacul din preparatul enzimatic. Rezultatele s-au exprimat în activitate specifică (raportul dintre extincția citită la 420 mμ, cuvă 2 cm și concentrația proteică în mg/ml a preparatului respectiv).

Catepsinele D, E și proteazele alcaline s-au determinat în modul următor: Din hemoglobina preparată ca la „Substrate" s-au luat 2 ml, 0,5 ml tampon și 0,5 ml enzimă. S-au întrebuințat tampon citrat-HCl la pH 2,5, 3,5 și 5,0 și tamponul tris-HCl la pH 8,2 și 9,0, cu incubare o oră la 37°C. Reacția s-a oprit cu 5 ml TCA 10%. Martorul a fost format din hemoglobină în tampon la 37°C, o oră, peste care s-au adăugat TCA 10% și enzima. Precipitatul s-a filtrat și supernatantul s-a citit la 280 nm [8]. La toate enzimele, activitățile s-au exprimat și în activitate specifică (la 1 mg proteină în preparatul întrebuințat).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Activitatea catepsinei D repartizată pe fracțiuni. În tabela 1 redăm concentrația proteică și activitatea suspensiilor fracțiunilor în apă distilată.

Tabela 1

Activitatea catepsinei D din omogenat și din fracțiuni subcelulare izolate din ficatul de șobolan, suspendate în apă distilată

Fracțiunea	Cantitatea de proteine mg/ml *a*	Activitatea proteolitică $E^{0.5}_{280\ nm}$ *b*	Activitatea specifică *b/a*
Omogenat	15	0,18	0,012
Nuclei (940 g)	15	0,23	0,015
Mitocondrii (5 000 g)	18	0,84	0,047
Lizozomi (21 000 g)	8	0,53	0,066
Vezicule micropinocitare (39 000 g)	9	0,070	0,007
Microzomi (105 000 g)	9	0	0
Supernatant	60	0	0

Se observă că la suspensiile de mitocondrii şi lizozomi activităţile specifice variază foarte mult de la preparat la preparat. S-ar putea ca acest fapt să se datoreze întrebuinţării apei distilate, care va liza deosebit fiecare formaţiune, aşa că activităţile eliberate vor fi mai mari sau mai mici. Variaţia activităţilor s-ar putea explica şi prin autoliza limitată a enzimelor din probe, fiind demonstrată autoliza formaţiunilor chiar la pH 8,0 şi la 0°C [24], [25]. Deoarece nu totdeauna s-a păstrat acelaşi interval de timp de la decapitare pînă la luarea în lucru, diferenţele de timp pot conduce la diferenţe de activitate.

Pe lîngă activitatea specifică maximă de la lizozomi, am obţinut o activitate mare şi la mitocondrii. Aceasta din urmă poate fi datorată atît existenţei enzimelor proteolitice proprii [26], cît şi contaminării cu lizozomi. Se cunosc marea eterogenitate a lizozomilor din ficat [27], [28] şi faptul că lizozomii cei mai voluminoşi se pot depune împreună cu mitocondriile. De remarcat lipsa de activitate la microzomi şi supernatant, precum şi activitatea extrem de slabă la veziculele pinocitare.

Activitatea proteolitică a supernatantului la pH-uri şi pe substrate diferite, cu şi fără adaos de cisteină. Deoarece se menţionează că proteinazele alcaline sînt localizate difuz pe toate fracţiunile, cu mai mult de jumătate din activitate în fracţiunea supernatant [18], şi deoarece substratul întrebuinţat de obicei pentru pH alcalin este albumina [11], am determinat activitatea proteolitică a supernatantului la pH alcalin, pe albumină, dar şi pe hemoglobină. Albumina nu s-a hidrolizat decît

Tabela 2

Activitatea proteolitică specifică a supernatantului (citoplasma liberă de formaţiuni) la diferite pH-uri, cu şi fără adaos de cisteină.

$E^{0,5}_{280\ nm} \times 10^{-3}$

Substrat	pH							
	2,5		3,5		8,1		9,0	
		cist.		cist.		cist.		cist.
Albumină	—	—	—	—	10	10	—	—
Albumină denaturată	—	—	—	—	10	110	—	—
Hemoglobină	5	9	17	18	40	47	120	140
Activitate specifică	—	—	—	—	1,6	1,8	5	6

denaturată, în prezenţa cisteinei şi numai la pH alcalin. Activitatea obţinută este însă extrem de redusă. Enzima din muşchiul scheletic hidrolizează albumina nativă maximum la pH 8,5 — 9,0 şi este activată 20% de cisteină [11]. Întrebuinţînd însă hemoglobina, ca substrat, am obţinut şi la ficat o activitate maximă la pH 9,0, însă activitatea specifică este redusă. Şi această enzimă este activată în jur de 20% de cisteină. După cum reiese din tabela 2, există o activitate foarte slabă şi la pH acid; ea se poate datora contaminării supernatantului cu formaţiuni care au catepsină D.

Se pare deci că ficatul conţine în citoplasmă o enzimă de pH alcalin, asemănătoare enzimei din muşchiul scheletic, dar cu o activitate specifică

mult mai mică și acționînd de predilecție pe hemoglobină. Deoarece activitatea specifică este foarte mică, nu trebuie exclusă nici posibilitatea ca această activitate să fie datorată peptidazelor alcaline localizate în supernatant [29] și care să acționeze pe urmele de peptide din hemoglobina denaturată.

Activitatea proteolitică a suspensiilor de mitocondrii și de lizozomi pe hemoglobină, la diferite pH-uri. S-au determinat pe suspensii în zaharoză, concentrația proteică și activitatea proteolitică la următoarele pH-uri: 2,5, 3,5, 5,0, 8,1 și 9,0 (fig. 1). Este cunoscută localizarea de predilecție în *lizozomi* a catepsinei D, cu pH optim de activitate 3,5 [18]; enzima nu scindează substratele sintetice folosite pentru celelalte catepsine. Ea reprezintă aproape toată activitatea proteolitică a extractului total de ficat [30]. Activitatea specifică mare a lizozomilor la pH 2,5, poate fi datorată fie catepsinei E [10], fie catepsinei D, care acționează destul de intens și la acest pH [8], fie intervenției comune a ambelor sisteme.

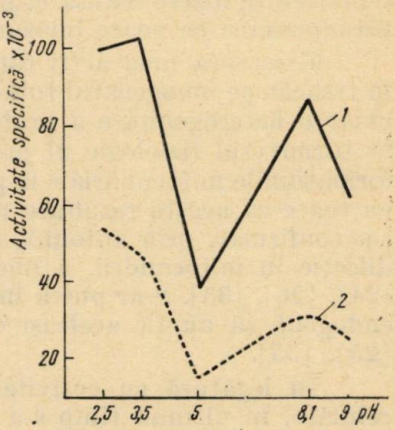


Fig. 1. — Activitatea proteolitică a mitocondriilor și lizozomilor pe hemoglobină ca substrat, la diferite pH-uri, exprimată în activitate specifică $E^{0,5}_{280\ nm}$/mg proteină/ml.
1 — Lizozomi; *2* — mitocondrii.

Existența în *mitocondrii* a unei activități specifice mari la pH 3,5 se explică prin impurificarea cu lizozomi a formațiunii separate la 5 000 g [29]. Cum activitatea specifică a enzimei din lizozomi este foarte mare, o impurificare se poate manifesta printr-o activitate puternică. Cu totul surprinzătoare la mitocondrii este activitatea specifică mare la pH 2,5. Doar prezența catepsinei E poate explica o activitate atît de ridicată, deoarece urmele de catepsină D nu o pot face. Nu am găsit însă semnalarea catepsinei E la ficat și, implicit, nici la lizozomi sau mitocondrii. Catepsina E, avînd pH-ul optim atît de apropiat de acela al catepsinei D și acționînd pe aceleași substrate, nu se poate identifica decît printr-o separare prealabilă.

Comparînd rezultatele noastre cu cele din literatură, se constată că pH-ul optim de activitate al proteazelor acide variază considerabil cu substratul întrebuințat. Astfel, la lizozomii din splină [8], pentru hemoglobină, pH-ul optim este 3,5, iar pentru albumină 4,2; la lizozomii din ficat, pentru globină 4,4—5,6 [29] și pentru hemoglobină 3,5 (fig. 1)

În acest fel se sugerează posibilitatea să existe mai mult decît o singură cale de proteoliză, fiecare predominînd în funcție de proteina hidrolizată și, poate, și de condițiile experimentale diferite [25].

La pH 5,0, atît la lizozomi, cît și la mitocondrii se obține o activitate foarte redusă. De altfel, Kusovleva și Chung-Yen [30] obțin pe extractul total de ficat, la pH 6,0, o inflexiune a curbei activității în funcție de pH, cu toate că separă pe gel de amidon o fracțiune proteică distinctă, cu activitate optimă la acest pH.

Deoarece s-a demonstrat existenţa unor enzime proteolitice cu pH optim alcalin la muşchi [11], creier [12] şi cornee [13], am determinat activitatea proteolitică şi la pH 8,1 şi 9,0. Am evidenţiat, atît la mitocondrii, cît şi la lizozomi, o activitate specifică cu numai aproximativ 30% mai mică decît la pH 3,5. Cu aceeaşi metodă nu s-a putut evidenţia nici o urmă de activitate la formaţiunile din splină [8]. Se poate presupune că această activitate se datoreşte catepsinei D. Cum însă am obţinut o activitate foarte redusă la pH 5,0, urmată de creşterea la pH 8,1 şi 9,0, presupunerea se poate înlătura cu uşurinţă.

Existenţa unei activităţi proteazice alcaline la ficat s-a semnalat în treacăt pe omogenatul total [31], [32]. Marks şi Lajtha, [32] presupun chiar o heterogenitate a proteazelor neutre tisulare, cu participarea lor la turnoverul fiziologic al proteinelor. Catabolizarea albuminei de către formaţiunile mitocondriale la pH 7,0 [33] se poate datora aceleiaşi enzime, cu toate că aceste rezultate nu au mai fost confirmate [34]. Mai recent s-a confirmat, prin autoliză, existenţa în formaţiunile din ficat, cu predilecţie în mitocondrii, a unei enzime proteolitice cu pH optim alcalin [24], [26], [35]. S-ar putea însă ca enzimele care acţionează în proteoliza endogenă să nu fie aceleaşi care atacă proteinele adăugate ca substrat [25], [35].

În legătură cu activitatea proteolitică neutră a unor formaţiuni celulare, în ultimul timp s-a sugerat că aceasta nu ar fi decît o manifestare a activităţii ribonucleazei alcaline endogene, care se determină tot la 280 nm [36].

Activitatea catepsinelor A şi B. După ce a sugerat iniţial localizarea lizozomală a catepsinei A, Rademaker a revenit, demonstrînd asocierea ei cu mitocondriile (citat în [29]). De atunci au apărut scurte menţiuni asupra prezenţei catepsinei A în preparate purificate de lizozomi din ficat [37] şi din rinichi [38], iar recent sînt publicate date asupra distribuţiei sale în formaţiunile din ficat [29], cu indicaţia localizării lizozomale.

Rezultatele noastre (tabela 3) indică o distribuţie atît în mitocondrii, cît şi în lizozomi, cu o localizare slab preferenţială în lizozomi. Din tabelă reiese că activitatea este mai mare pe suspensii de formaţiuni intacte decît pe suspensii în apă distilată. Centrifugarea suspensiilor de mitocondrii măreşte considerabil activitatea specifică în supernatant; lizozomii nu au aceeaşi comportare.

Deoarece variaţia repartiţiei pe formaţiuni [29] s-ar putea datora unei eliberări diferite, am determinat activitatea catepsinei A pe supernatantul probelor îngheţate şi dezgheţate de 3 ori. În aceste condiţii, activităţile specifice aproape se triplează la mitocondrii şi se dublează la lizozomi; în final, activităţile sînt sensibil egale la cele două formaţiuni.

Deoarece rolul catepsinei A în celulă este total necunoscut, rezultatele nu le putem asocia decît, eventual, cu menţionarea recentă a catepsinei A ca o exopeptidază, ea acţionînd pe substratele eliberate în urma acţiunii catepsinei D [39].

Cît priveşte catepsina B, localizarea ei lizozomală [4], [5] este unanim recunoscută. Rezultatele din tabela 3 arată aceeaşi localizare lizozomală, dar cu o activitate specifică ridicată şi la mitocondrii. Înghe-

țarea și dezghețarea preparatelor duc la o eliberare considerabilă de activitate, activitatea inițială triplîndu-se.

Reiese că în formațiuni catepsinele A și B sînt enzime „lente", care se eliberează prin sfărîmarea formațiunilor.

Din rezultate mai reiese coexistența în aceeași fracțiune a tuturor tipurilor de enzime proteolitice, de pH-uri optime acide și alcaline. Doar

Tabela 3

Activitatea specifică a catepsinelor A și B : catepsina A, $E\ ^{0,5}_{570\ nm} \times 10^{-3}$; catepsina B, $E\ ^{2,0}_{420\ nm} \times 10^{-3}$

Formațiunea	Mediul de suspensie	Suspensie	Supernatantul suspensiei centrifugate 30 min la 21 000 g	Supernatantul suspensiei înghețate și dezghețate de 3 ori și centrifugate 30 min la 21 000 g
		Catepsina A		
Mitocondrii	apă	7	12	26
	zaharoză	12	25	35
Lizozomi	apă	16	12	33
	zaharoză	21	16	35
		Catepsina B		
Mitocondrii	zaharoză	—	48	125
Lizozomi	zaharoză	—	58	185

o compartimentare strictă a formațiunilor, cu bariere de permeabilitate care să separe enzima de substrat și enzimele între ele, poate explica coexistența și diferențele de activitate la fiecare formațiune.

Această distribuție aproape similară a enzimelor proteolitice pe cele două formațiuni indică o contaminare reciprocă puternică. Metoda de separare nu reușește să dea decît fracțiuni îmbogățite în cîte o formațiune. Din această cauză nu am putut demonstra o localizare preferențială într-o formațiune a unei enzime proteolitice, ci doar faptul că enzimele cu pH-uri optime acide (catepsinele D, E și B, respectiv 3,5, 2,5 și 5,0) au activitatea specifică mai mare în lizozomi.

CONCLUZII

Metoda întrebuințată pentru separarea formațiunilor nu a reușit să dea decît fracțiuni îmbogățite în cîte o formațiune, și nu formațiuni pure.

Catepsinele D și B sînt localizate preferențial în lizozomi, iar catepsina A este distribuită sensibil egal pe ambele formațiuni.

Catepsina E ar putea fi prezentă în ficat atît la mitocondrii, cît și la lizozomi.

Proteaze alcaline cu activitate specifică mare (aproape 70% din aceea a catepsinei D) sînt prezente în ambele fracțiuni și cu o activitate specifică foarte redusă în citoplasma solubilă.

Prezentat la redacție
la 29 decembrie 1969

Sectorul de imunochimie,
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. J. S. Fruton, în *Enzymes*, sub red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, vol. 4, Academic Press, Londra, New York, 1960, p. 233.
2. S. Mahadevan, A. L. Tappel, J. biol. Chem., **242**, 2369 (1967).
3. A. A. Iodice, V. Leong, I. M. Weinstock, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 477 (1966).
4. L. M. Greenbaum, J. S. Fruton, J. biol. Chem., **226**, 173 (1957).
5. O. Snellman, Biochem. J., **144**, 673 (1969).
6. G. De La Haba, P. S. Cammarata, S. N. Timasheff, J. biol. Chem., **234**, 316 (1959).
7. R. J. Planta, M. Gruber, Biochim. biophys. Acta, **89**, 503 (1964).
8. E. M. Press, R. Porter, J. Cebra, Biochem. J., **74**, 501 (1960).
9. A. J. Barrett, Biochem. J., **104**, 601 (1967).
10. C. Lapresle, T. Webb, Biochem. J., **84**, 455 (1962).
11. T. R. Koszalka, L. L. Miller, J. biol. Chem., **235**, 669 (1960).
12. N. Marks, A. Lajtha, Biochem. J., **97**, 74 (1965).
13. R. Van Heyningen, S. G. Waley, Biochem. J., **86**, 92 (1963).
14. R. Gianetto, C. De Duve, Biochem. J., **59**, 433 (1955).
15. J. T. Finkenstaedt, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **95**, 302 (1957).
16. J. M. W. Bouma, M. Gruber, Biochim. biophys. Acta, **89**, 545 (1964).
17. J. M. W. Bouma, M. Gruber, Biochim. biophys. Acta, **113**, 350 (1966).
18. C. De Duve, R. Wattiaux, P. Baudhuin, Advanc. Enzymol., **24**, 291 (1962).
19. C. Motaș, V. Gheție, St. cerc. biochim., **12**, 69 (1969).
20. V. Gheție, C. Motaș, St. cerc. biochim., în acest număr.
21. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
22. S. Moore, W. H. Stein, J. biol. Chem., **211**, 907 (1954).
23. R. H. Brown, G. D. Duda, Arch. Biochem. Biophys., **66**, 301 (1957).
24. K. G. M. M. Alberti, W. Bartley, Biochem. J., **111**, 763 (1969).
25. K. G. M. M. Alberti, W. Bartley, Biochem. J., **87**, 104 (1963).
26. K. Fitzpatrick, R. J. Pennington, Biochem. J., **111**, 29P (1969).
27. Y. E. Rahman, J. F. Howe, S. L. Nance, J. F. Thomson, Biochim. biophys. Acta, **146**, 484 (1967).
28. Y. E. Rahman, E. A. Cerny, Biochim. biophys. Acta, **178**, 61 (1969).
29. J. W. Coffey, C. De Duve, J. biol. Chem., **243**, 3255 (1968).
30. O. B. Kusovleva, W. Chung-Yen, Biohimia, **24**, 550 (1959).
31. S. G. Waley, R. Van Heyningen, Biochem. J., **83**, 274 (1962).
32. N. Marks, A. Lajtha, Biochem. J., **89**, 438 (1963).
33. N. W. Penn, Biochim. biophys. Acta, **53**, 490 (1961).
34. W. L. Beeken, K. Imredy, Biochim. biophys. Acta, **62**, 579 (1962).
35. G. D. Baird, Biochim. biophys. Acta, **93**, 293 (1964).
36. R. Umana, Arch. Biochem. Biophys., **129**, 767 (1969).
37. P. L. Sawant, I. D. Desai, A. L. Tappel, Biochim. biophys. Acta, **85**, 93 (1964).
38. S. Shibko, A. L. Tappel, Biochem. J., **95**, 731 (1965).
39. A. A. Iodice, Arch. Biochem. Biophys., **121**, 241 (1967).

THE DISTRIBUTION OF PROTEASE ON SUBCELLULAR FRACTIONS OF RAT LIVER

SUMMARY

The distribution of proteases on rat liver subcellular fractions separated by centrifugation at 5,000 g (mitochondria), 21,000 g (lysosomes) and 105,000 g (microsomes and soluble phase of the cell) was studied. By this method there cannot be obtained pure mitochondrial and lysosomal formations but only fractions rich in these formations.

Localization of cathepsins D and B was shown in mitochondria and particularly in lysosomes; cathepsin A was found to be sensibly equally distributed between the two formations.

The high specific activity at pH 2,5 of both mitochondria and lysosomes suggests the presence of cathepsin E in the liver.

By using haemoglobin as substrate, the alkaline proteases were found both in mitochondria and lysosomes and not in the soluble phase of the cell. The possibility that this specific activity might belong to alkaline ribonucleases is discussed. Specific activities of all proteolytic enzymes considerably differ from one preparation to another.

The two items in discussion were the presence in the cell of more than one way of proteolysis, each way prevailing according to each hydrolysed protein, and the coexistence of all kinds of proteolytic enzymes within the same fraction.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 179–182 (1970)

ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ A PROTEINELOR SARCOPLASMATICE TRATATE CU 1-FLUORO-2,4-DINITROBENZEN

D. TĂNĂSESCU şi TR. BENŢIA

Rezumat. — S-a urmărit modificarea imaginii electroforetice în gel de poliacrilamidă a proteinelor sarcoplasmatice incubate cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB) de diverse concentraţii şi la temperaturi diferite. S-au observat următoarele : prin incubarea proteinelor cu FDNB la 3°C, timp de o oră, au loc modificări la nivelul fracţiunilor principale anodice ; prin incubare la 30°C, timp de o oră, dispare total una din fracţiunile anodice şi au loc modificări evidente ale fracţiunilor catodice ; prin incubare la 50°C, timp de 30 min, imaginea electroforetică se modifică profund, fiind afectat un număr important de fracţiuni proteice, care precipită în urma incubării cu FDNB ; prin incubarea proteinelor sarcoplasmatice la 30°C, timp de 30 min, au loc modificări şi la nivelul izoenzimelor lacticodehidrogenazei.

Din rezultatele obţinute rezultă că FDNB acţionează specific numai asupra unor anumite tipuri de proteine sarcoplasmatice, ceea ce face ca această substanţă să poată fi utilizată şi la studiul metabolismului muscular.

În ultimul timp, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenul (FDNB), substanţă utilizată de către Sanger la determinarea grupărilor N terminale ale proteinelor [1], a început să aibă un cîmp de aplicare mai larg. Astfel, constatîndu-se că la o concentraţie de 0,38 mM el este un inhibitor puternic şi specific al creatinkinazei [2], s-a întrebuinţat la studiul metabolismului substanţelor macroergice musculare [3], [4], [5]. De asemenea, observîndu-se că intră în categoria factorilor care pot produce o desensibilizare a enzimelor cu caracteristici allosterice, a fost utilizat la studiul proprietăţilor cinetice şi catalitice a numeroase enzime cu rol de reglare [6], [7], [8].

În lucrarea de faţă s-a studiat acţiunea 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenului asupra proteinelor sarcoplasmatice. Efectul produs de această substanţă a fost cercetat prin analiza electroforetică, în gel de poliacrilamidă, a proteinelor incubate timp de o oră sau 30 min, cu diferite concentraţii de FDNB şi la temperaturi cuprinse între 3 şi 50°C. De asemenea, pentru a avea un test suplimentar al efectelor produse de diferite concentraţii de FDNB, s-a efectuat şi electroforeza izoenzimelor lacticodehidrogenazei.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe muşchi gastrocnemieni de şobolan (rasa Wistar). După ce aceştia au fost tăiaţi mărunt sau îngheţaţi în azot lichid, proteinele sarcoplasmatice s-au extras prin omogenizare cu zaharoză 0,3 M

în tris-HCl 0,04 M, pH 7,5, în raportul 1 g mușchi/3 ml extractant. Omogenatul s-a centrifugat la rece, succesiv la 3 000 g timp de 15 min și la 12 000 g timp de 30 min.

Supernatantul perfect limpede a fost incubat cu concentrații variate de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen, și anume cu 2,6, 2,15, 1,34, 0,78 și 0,26 mM. Temperaturile la care s-au făcut incubările au fost de 3, 30 și 50°C, ultimele două temperaturi fiind menținute cu variații între $\pm$ 0,1°C, utilizînd un ultratermostat tip Wobser. După incubare, probele au fost centrifugate 15 min la 3 000 g. S-a analizat atît precipitatul depus, cît și supernatantul rămas după centrifugare. Durata incubării a fost de o oră atunci cînd s-a lucrat la temperaturile de 3 și 30°C și de 30 min la 50°C.

Soluția de FDNB a fost preparată conform recomandărilor lui Marechal [9]. Soluția de rezervă a fost făcută în tampon tris-HCl, 0,04 M, pH 7,5.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor sarcoplasmatice s-a efectuat vertical, după o tehnică descrisă anterior [10]. Concentrația gelului a fost de 7%, tamponul utilizat a fost tris-borat-EDTA, pH 7,15, și s-a lucrat la 25 mA și 280 V. Colorarea proteinelor s-a făcut cu o soluție de Amidoschwarz 0,5% în acid acetic 7%. Decolorarea s-a făcut prin spălări succesive cu acid acetic 5%. Electroforeza precipitatului format după incubarea cu FDNB s-a făcut după o prealabilă dializă față de tampon tris-HCl, 0,04 M, pH 7,5.

Separarea electroforetică a izoenzimelor lacticodehidrogenazei s-a făcut orizontal, în gel de poliacrilamidă 7% și în tampon glicocol-tris, pH 8,4. Evidențierea izoenzimelor s-a făcut prin imersarea gelului într-o soluție care conținea tampon tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, fenazinmetosulfat, nitrobluetetrazoliu, NAD, iar ca substrat lactat de litiu [11].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin utilizarea electroforezei în gel de poliacrilamidă, procedeu cu mare putere de rezoluție a fracțiunilor proteice, s-a căutat să se constate gradul de modificare al imaginii electroforetice a proteinelor sarcoplasmatice incubate la temperaturi diferite și cu concentrații variate de FDNB. Scopul acestei cercetări a fost de a se preciza modificările cantitative care au loc, urmînd ca în cercetări viitoare să se analizeze atît efectul pe care-l exercită FDNB asupra proceselor metabolice musculare, respectiv asupra glicolizei, cît și asupra unor enzime glicolitice cu caracteristici allosterice, în prealabil cristalizate.

Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice incubate cu concentrații de FDNB cuprinse între 2,69 și 0,26 mM, la 3°C, timp de o oră, pune în evidență modificări cantitative moderate ale fracțiunilor proteice (fig. 1).

Cea mai evidentă modificare este observată la nivelul celor două fracțiuni principale anodice, una dintre ele devenind din ce în ce mai slabă, modificîndu-și în același timp viteza de migrare și suprapunîndu-se cu cealaltă fracțiune. În general însă, prin incubarea la 3°C, modificările nu sînt prea pronunțate și au loc numai la concentrațiile de 2,69 și 2,15 mM FDNB.

Nu putem spune însă același lucru în cazul proteinelor incubate la 30°C și, mai ales, la 50°C. Astfel, incubînd la 30°C, se constată, în prezența a 2,69 și 2,15 mM FDNB, dispariția totală a uneia dintre fracțiunile anodice și, în același timp, o evidentă modificare a primelor două fracțiuni catodice (fig. 2). În plus, se mai constată o inversare a intensității celor două spoturi catodice, proporțional cu creșterea concentrației de FDNB.

Prin incubarea la 50°C, timp de 30 min, efectul FDNB este drastic, comparativ cu cele două probe martor supuse electroforezei, una păstrată la 3°C și alta păstrată la 50°C, pentru aceeași perioadă de timp (fig. 3).

Multe dintre fracțiunile anodice, catodice și intermediare sînt profund afectate, nemaiapărînd în electroforeogramă. Astfel, din figura 3 se constată dispariția uneia dintre fracțiunile principale anodice, intensificarea primei fracțiuni catodice la concentrația de 0,26 mM FDNB, dar slăbirea ei la concentrațiile de 0,78, 1,34 și 2,15 mM, ceea ce se întîmplă de altfel și cu cealaltă fracțiune principală catodică. De asemenea, se constată dispariția totală la concentrațiile de 0,78, 1,34 și 2,15 mM FDNB a fracțiunilor intermediare, precum și a uneia dintre cele două fracțiuni anodice principale. La concentrația de 2,69 mM FDNB este modificată întreaga imagine electroforetică a proteinei incubate.

Pentru a aprecia mai clar care sînt fracțiunile care precipită prin incubarea proteinei la 30°C, timp de o oră, cu concentrațiile crescînde de FDNB utilizate, s-a făcut electroforeza precipitatului format. Acesta a fost reluat după dializă cu un volum minim de tampon tris-HCl 0,04 M, pH 7,5.

Din figura 4 se poate observa că fracțiunile proteice care au precipitat posedă o migrare electroforetică ce corespunde, în esență, cu aceea a fracțiunilor modificate în condițiile descrise anterior. Au fost localizate 4 pînă la 6 fracțiuni, în funcție de concentrația FDNB.

Prin separarea electroforetică a izoenzimelor lacticodehidrogenazei din extractul tratat cu concentrații de 2,15 și 2,69 mM FDNB, timp de 30 min, la 30°C, se pot nota două observații (fig. 5).

Prima observație este că la concentrația de 2,15 mM FDNB izoenzimele LDH_2 și LDH_3 prezintă o tendință evidentă de a se disocia, apărînd cîte două benzi cu activitate enzimatică. A doua observație este că la concentrația de 2,69 mM FDNB intensitatea benzii care reprezintă izoenzima LDH_5, tip mușchi, scade evident, ceea ce denotă că o parte din proteina cu activitate enzimatică este afectată de FDNB. Deocamdată ne limităm la aceste observații vizuale, neavînd încă date care să ne permită explicarea proceselor ce au loc la nivelul izoenzimelor LDH.

Rezultatele obținute ne permit să facem o analogie cu efectele produse de clorura de trimetilamoniu-stilben, o sare cuaternară de amoniu, care de asemenea reacționează specific cu unele tipuri de proteine sarcoplasmatice [12], [13], [14], evident fracțiunile proteice nefiind aceleași în cazul celor două substanțe.

În concluzie, putem spune că FDNB acționează specific numai asupra unor anumite tipuri de proteine sarcoplasmatice, pe care le scoate din soluția extractului proteic muscular. Intensitatea efectului produs

de FDNB este dependentă de concentrație, precum și de temperatura la care s-a incubat proteina. Utilizarea FDNB se poate extinde, prin urmare, și la studiul metabolismului muscular, putînd constitui o nouă posibilitate de investigare a proceselor glicolitice care au loc în mușchi.

Prezentat la redacție
la 24 decembrie 1969

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. F. Sanger, Biochem. J., **39**, 507 (1945).
2. S. A. Kuby, T. A. Mahowald, Fed. Proc., **18**, 267 (1959).
3. D. F. Cain, A. A. Infante, R. E. Davies, Nature, **196**, 214 (1962).
4. D F. Cain, R. E. Davies, Biochem. biophys. Res. Comm., **8**, 361 (1962).
5. M. Y. Kusmerich, R. E. Davies, Biochim. biophys. Acta, **153**, 279 (1968).
6. B. L. Horecker, S. Pontremoli, O. Rosen, S. Rosen, Fed. Proc., **25**, 1521 (1966).
7. L. B. Rothman, E. Cabib, Biochemistry, **6**, 2098 (1967).
8. G. Philip, D. J. Graves, Biochemistry, **7**, 2093 (1968).
9. G. Marechal, *Le metabolisme de la phosphocreatine et de l'adenosine triphosphate durant la contraction musculaire*, Arscia, Bruxelles, Maloire, Paris, 1964.
10. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc biochim., **13**, 313 (1968).
11. I. H. Fine, L. A. Costello, *Methods in Enzymology*, vol. VI, 1963, p. 958.
12. H. D. Schell, St. cerc. biochim., **6**, 547 (1963).
13. H. D. Schell D. Tănăsescu, Rev. roum. Biochim., **6**, 163 (1969).
14. D. Tănăsescu, H. D. Schell, Rev. roum. Biochim. **7**, (1970).

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF THE SARCOPLASMATIC PROTEINS INCUBATED WITH 1-FLUORO-2, 4-DINITROBENZENE

SUMMARY

The modification of electrophoretic patterns in polyacrylamide gel of sarcoplasmatic proteins incubated with various concentrations of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene FDNB at different temperatures was studied and the following results were obtained :

1. By incubation of the protein with FDNB at 3° for 1 hour modifications take place at the level of the principal anode fractions ;

2. By incubation at 30° for 1 hour one of the anode fractions entirely disappears and obvious modifications occur in cathode fractions ;

3. By incubation at 50° for 30 minutes the electrophoretic pattern is profoundly modified, an important number of protein fractions being affected, which precipitate after incubation with FDNB ;

4. By incubation of sarcoplasmatic proteins at 30° for 30 minutes modifications also occur at the level of lacticodehydrogenase isoenzymes.

These findings suggest that FDNB has a specific action only upon certain sarcoplasmatic protein types ; for this reason this substance could be used in the study of muscular metabolism.

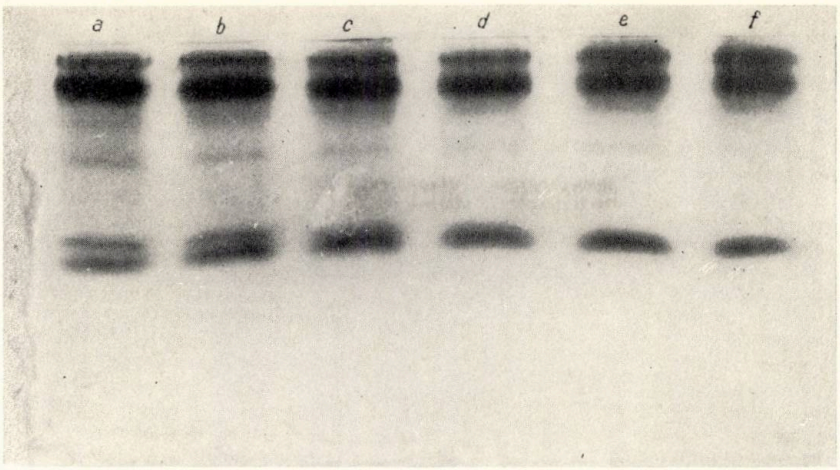


Fig. 1. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă 7% a extractelor proteice musculare incubate o oră la 3°C cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB).

a — Martor; *b* — 0,26 mM FDNB; *c* — 0,78 mM FDNB; *d* — 1,34 mM FDNB; *e* — 2,15 mM FDNB; *f* — 2,60 mM FDNB.

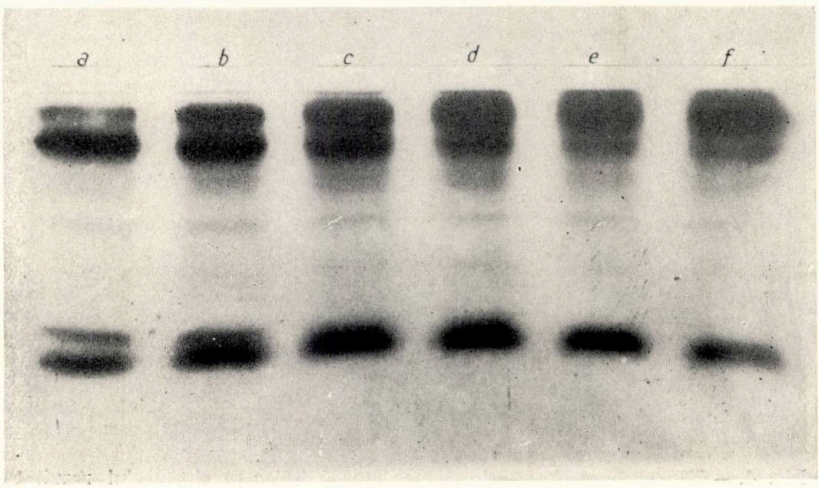


Fig. 2. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă 7% a extractelor proteice musculare incubate o oră la 30°C cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB).

a — Martor; *b* — 0,26 mM FDNB; *c* — 0,78 mM FDNB; *d* — 1,34 mM FDNB; *e* — 2,15 mM FDNB; *f* — 2,60 mM FDNB.

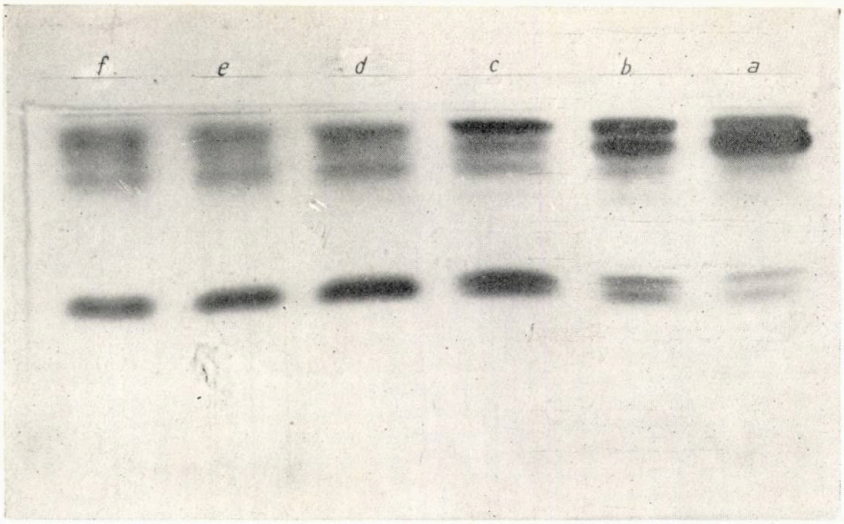


Fig. 3. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă 7% a extractelor proteice musculare incubate 30 min la 50°C.

a — Martor păstrat 30 min la 3°C; *b* — martor păstrat 30 min la 50°C; *c* — 0,78 mM FDNB; *d* — 1,34 mM FDNB; *e* — 2,15 mM FDNB; *f* — 2,60 mM FDNB.

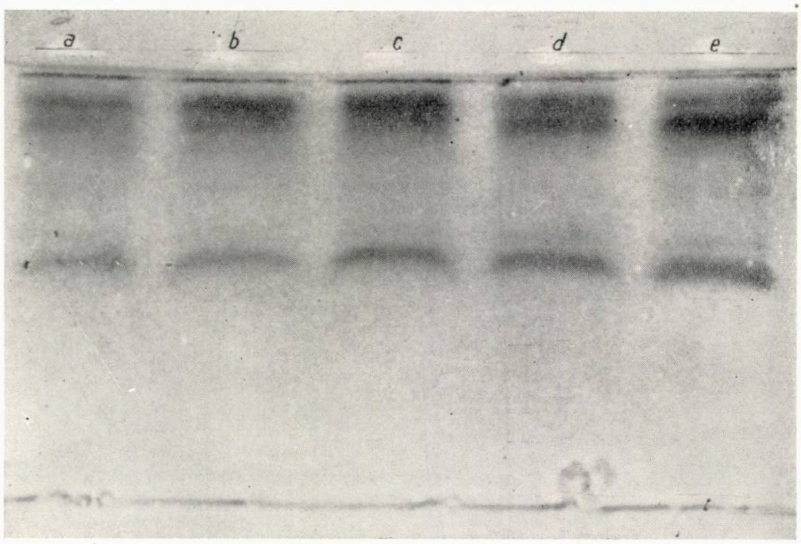


Fig. 4. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă 7% a precipitatului rezultat prin incubarea extractului muscular o oră la 30°C. Înainte de electroforeză precipitatul a fost dializat 24 de ore față de tampon tris-HCl 0,4 M, pH 7,5.

Precipitatul format prin incubarea extractului muscular cu: *a* — 0,26 mM FDNB; *b* — 0,78 mM FDNB; *c* — 1,34 mM FDNB; *d* — 2,15 mM FDNB; *e* — 2,60 mM FDNB.

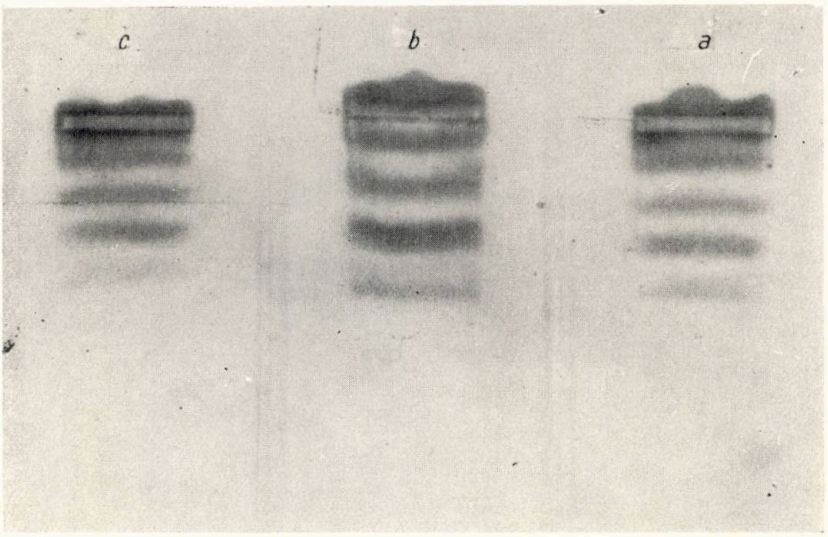


Fig. 5. — Electroforeză orizontală în gel de poliacrilamidă 7% a izoenzimelor lacticodehidrogenazei din extractul muscular incubat cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB), 30 min la 30°C.

a — Martor; *b* — extract tratat cu 2,15 mM FDNB; *c* — extract tratat cu 2,36 mM FDNB.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 183–187 (1970)

COMPORTAREA PROTEINELOR SARCOPLASMATICE FAȚĂ DE UNELE SĂRURI CUATERNARE DE AMONIU DERIVATE DE LA STILBEN ÎN FILOGENIE

H. D. SCHELL

Rezumat. — Sărurile cuaternare de amoniu de tipul pahicurarelor derivate de la dimetil-alchil-amoniu-stilben (alchil = metil, etil, butil, octil, cetil) formează complecşi în mod selectiv doar cu anumite fracţiuni ale proteinelor sarcoplasmatice. Acest fenomen se observă la proteinele musculare de la cele mai diferite specii animale, indiferent de gradul lor de evoluţie filogenetică. Din numărul mai mic sau mai mare de fracţiuni anodice ale proteinelor sarcoplasmatice, număr care depinde de locul ocupat de specia animală în scara filogenetică, reacţionează în general doar o singură fracţiune, cel mult două (în cazul broaştei), cu sărurile cuaternare prin formare de complecşi. Aceştia pot fi izolaţi, purificaţi şi scindaţi în componentele lor : proteină şi sare cuaternară de amoniu.

În lucrări anterioare s-a arătat că sărurile cuaternare de amoniu de tipul pahicurarelor reacţionează prin formare de complecşi doar cu anumite fracţiuni ale proteinelor serice, musculare sau cerebrale [1], [2], [3]. Complecşii rezultaţi se pot izola, purifica şi scinda în părţile lor componente. S-a constatat totodată că, în cazul proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul striat de şobolan, fracţiunea proteică care formează complexul cu sarea cuaternară de amoniu îşi păstrează activitatea biologică (activitatea lacticodehidrogenazică) şi după ce a fost eliberată din complex [4].

În lucrarea de faţă ne-am propus să urmărim dacă şi în ce măsură sărurile cuaternare amintite reacţionează tot atît de selectiv şi cu proteinele altor specii de animale, care se deosebesc între ele prin gradul lor de evoluţie filogenetică. În acest scop am studiat interacţiunea proteinelor sarcoplasmatice din muşchii striaţi de lăcustă, peşte, broască, broască ţestoasă, şarpe, pasăre şi cobai cu săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben, de tipul dimetil-alchil-amoniu-stilbenului, care aparţin pahicurarelor (alchil = metil, etil, butil, octil, cetil).

MATERIAL ŞI METODE

Extracţia proteinelor. Proteinele sarcoplasmatice au fost extrase cu tampon fosfat (pH 7,6, forţă ionică 0,15), după indicaţiile date de Kasavina şi Torcinski [5], din muşchi striaţi de lăcustă (*Locusta migratoria*), peşte (*Cyprinus carpio*), broască (*Rana ridibunda*), broască ţestoasă (*Testudo graeca*), şarpe (*Natrix natrix*), porumbel (*Columbia livia do-*

mestica) şi cobai (*Cavia cobaya*). Muşchii izolaţi imediat după sacrificarea animalului au fost mai întîi cîntăriţi, mărunţiţi cu o foarfecă şi mojaraţi într-un mojar de porţelan, cu puţin nisip de cuarţ. Materialul mojarat a fost apoi introdus în eprubete de centrifugă, suspendat în tampon fosfat răcit la 0—4°C şi lăsat în frigider timp de 2 ore. Volumul tamponului adăugat a fost de 1 ml pentru 1 g ţesut. După aceea s-a centrifugat omogenatul timp de 30 min la 13 000 ture/min, iar supernatantul rezultat s-a folosit direct în experienţele ulterioare, fără dializă prealabilă.

Incubarea proteinelor musculare cu sărurile cuaternare. Pentru urmărirea interacţiunii proteinelor musculare de la animalele situate pe trepte diferite ale scării filogenetice cu sărurile cuaternare de amoniu, s-a lucrat în condiţiile folosite şi în cazul proteinelor serice [1]. Peste un anumit volum de extract muscular, de exemplu 0,5—1 ml, s-a adăugat picătură cu picătură o cantitate egală dintr-o soluţie de 3% clorură de trimetil-amoniu-stilben. După o oră de repaus la temperatura camerei în cazul extractelor musculare de la lăcustă, peşte, broască, broască ţestoasă şi şarpe sau la 37°C în cazul extractelor musculare de la animalele cu sînge cald, s-a centrifugat proba timp de 5 min la 4 000 ture/min, pentru depunerea complexului format. Supernatantul perfect limpede rezultat a fost apoi analizat electroforetic, folosindu-se drept martor extractul muscular respectiv, diluat 1 : 1 cu apă distilată.

Electroforeza pe gel de amidon. Gelul a fost preparat după indicaţiile lui Smith [6], dizolvînd 10,2 g amidon hidrolizat (BDH) în 100 ml tampon, borat de pH 8,8 (1,33 g acid boric + 0,34 g NaOH în 1 000 ml apă distilată), prin încălzire la fierbere şi tragere la trompă. Soluţia fierbinte de amidon s-a aplicat apoi pe plăci de sticlă de 4 × 20 cm (cîte 12—14 ml de placă). Drept start s-a folosit o bandă îngustă de 1,5 × 30 mm din hîrtie de filtru groasă (Whatman nr. 3), pe care s-au aplicat 30 µl din soluţia proteică de analizat. În cuvă s-a folosit un tampon borat de pH 8,5 (obţinut prin dizolvarea a 18,55 g acid boric şi 2,4 g NaOH în 1 000 ml apă distilată). După 17 ore de migrare la 120 V şi 0,3 mA/cm, electroforegramele au fost introduse pentru 4—5 min într-o soluţie 1‰ de Amidoschwarz 10 B, făcută într-un amestec de metanol-apă-acid acetic glacial (5 : 5 : 1), apoi au fost spălate de cîteva ori cu apă şi, în final, cu un amestec de metanol-apă-acid acetic glacial (5 : 5 : 1), pînă la decolorarea fondului.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dacă extractul muscular ce conţine proteinele sarcoplasmatice se tratează în condiţiile arătate cu o soluţie 3% de clorură de trimetil-amoniu-stilben, se formează chiar de la început, indiferent de specia de la care provine extractul, flocoane fine, care cu timpul se depun. Supunînd supernatantul analizei electroforetice, se observă, în comparaţie cu martorul, lipsa din electroforegramă a unei singure fracţiuni şi doar în cazul extractului muscular de la broască lipsa a două fracţiuni proteice, fără ca celelalte fracţiuni să prezinte vreo modificare în concentraţia relativă sau în viteza de migrare electroforetică. Proteinele care reacţionează cu sarea cuaternară de amoniu fac parte întotdeauna din fracţiunile anodice, şi anume din primele cinci, şi niciodată din cele catodice. Acest fapt este explicabil dacă se ia în considerare semnul sarcinilor electrice:

sarea cuaternară de amoniu, fiind încărcată pozitiv, va reacționa cu precădere cu fracțiunile anodice ale proteinelor, care sînt încărcate negativ. Dar, pe lîngă sarcina electrică, la formarea complexului trebuie să intervină în mod hotărîtor și alți factori, poate de natură sterică sau de alt gen, care să explice afinitatea atît de selectivă a sării cuaternare de amoniu pentru anumite fracțiuni anodice ale proteinelor sarcoplasmatice (fig. 1).

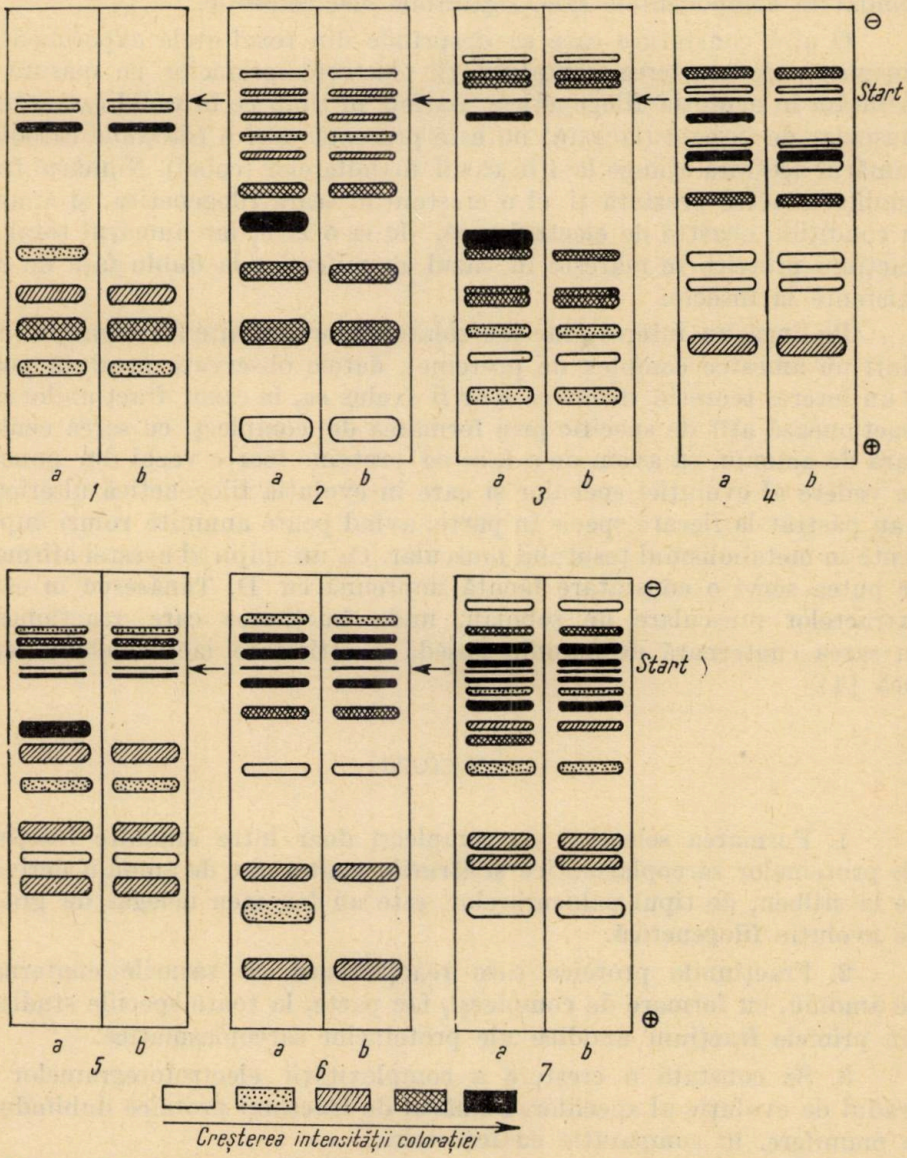


Fig. 1. — Electroforegramele extractelor musculare netratate (*a*) și tratate (*b*) cu sare cuaternară de amoniu (mărimea naturală redusă la jumătate).

1 — Lăcustă (*Locusta migratoria*); *2* — pește (*Cyprinus carpio*); *3* — broască (*Rana ridibunda*); *4*. — broască țestoasă (*Testudo graeca*); *5* — șarpe (*Natrix natrix*); *6* — porumbel (*Columbia livia domestica*); *7* — cobai (*Cavia cobaya*).

Flocoanele fine separate prin centrifugare sînt de natură proteică şi posedă aceeaşi fluorescenţă albastră ca şi sarea cuaternară de amoniu folosită derivată de la stilben. Aceasta denotă că sarea cuaternară de amoniu s-a legat de fracţiunea proteică, care lipseşte din electroforegrama extractului muscular tratat, prin formarea unui complex sare cuaternară-proteină. Cu ajutorul NaOH diluat, complexul poate fi scindat în componentele sale, separabile electroforetic.

O altă constatare care se desprinde din rezultatele experimentale obţinute este creşterea complexităţii electroforegramelor pe măsură ce înaintăm în evoluţia filogenetică. Astfel, în timp ce în cazul extractului muscular de insectă (lăcustă) nu este prezentă nici o fracţiune catodică, numărul acestora ajunge la 4 în cazul mamiferelor (cobai). Numărul fracţiunilor anodice prezintă şi el o creştere în scara filogenetică, şi anume, în condiţiile noastre de electroforeză, de la 6 la 9, iar numărul total de fracţiuni proteice se măreşte în cazul mamiferelor la dublu faţă de cele existente la insecte.

Pe lîngă un interes practic (izolarea unor anumite fracţiuni proteice dintr-un amestec complex de proteine), datele observate prezintă poate şi un interes teoretic, deoarece n-ar fi exclus ca, în cazul fracţiunilor care reacţionează atît de specific prin formarea de complecşi cu sarea cuaternară de amoniu, să avem de-a face cu proteine foarte vechi din punctul de vedere al evoluţiei speciilor şi care în evoluţia filogenetică ulterioară s-au păstrat la fiecare specie în parte, avînd poate anumite roluri importante în metabolismul ţesutului muscular. Ca un spijin al acestei afirmaţii ar putea servi o constatare făcută împreună cu D. Tănăsescu în cazul extractelor musculare de şobolan, unde fracţiunea care reacţionează cu sarea cuaternară de amoniu posedă o activitate lacticodehidrogenazică [4].

CONCLUZII

1. Formarea selectivă de complecşi doar între anumite fracţiuni ale proteinelor sarcoplasmatice şi sărurile cuaternare de amoniu derivate de la stilben, de tipul pahicurarelor, este un fenomen nelegat de gradul de evoluţie filogenetică.

2. Fracţiunile proteice care reacţionează cu sărurile cuaternare de amoniu, cu formare de complecşi, fac parte, la toate speciile studiate, din primele fracţiuni anodice ale proteinelor sarcoplasmatice.

3. Se constată o creştere a complexităţii electroforegramelor cu gradul de evoluţie al speciilor, numărul de fracţiuni proteice dublîndu-se la mamifere, în comparaţie cu insectele.

Prezentat la redacţie
la 31 decembrie 1969

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, St. cerc. biochim., **4**, 365 (1961).
2. H. D. SCHELL, St. cerc. biochim., **6**, 545 (1963).
3. H. D. SCHELL, St. cerc. biochim., **13**, (1970).
4. H. D. SCHELL, D. TĂNĂSESCU, Rev. roum. biochim., **6**, 163 (1969).
5. B. S. KASAVINA, J. M. TORCINSKI, Biohimia, **21**, 510 (1956).
6. I. SMITH, *Chromatographic and electrophoretic techniques*, vol. II, WILLIAM HEINEMANN, Ltd., Londra; Interscience Publ., Inc., New York, 1962, p. 131 și 133.

BEHAVIOUR OF SARCOPLASMATIC PROTEINS IN PHYLOGENY AGAINST SOME QUATERNARY AMMONIUM SALTS DERIVED FROM STILBENE

SUMMARY

Quaternary ammonium salts of pahicurara type derived from dimethyl-alkyl-ammonium-stilbene (alkyl=methyl, ethyl, butyl, octyl, cetyl) selectively form complexes with some sarcoplasmatic protein fractions. This phenomenon was evidenced with muscle proteins in the most different animal species, whatever their degree of phylogenetic evolution is. Out of the more or less big number of sarcoplasmatic protein anode fractions — a number depending on the place occupied by the animal species in the phylogenetic scale — one or at most two fractions (in frogs) generally react with quaternary salts by forming com[illegible]xes. These complexes can be isolated, purified and cleaved into their components: protein and quaternary ammonium salt.

ST. CERC BIOCHIM., 13, 2, 189 – 192 (1970)

CONȚINUTUL ÎN PROTEINĂ TOTALĂ ȘI ZEINĂ AL BOABELOR UNOR HIBRIZI DE PORUMB ÎN COMPARAȚIE CU GENITORII LOR

F. ZETEA și C. BODEA

Rezumat. — Prin determinarea conținutului în proteină totală și zeină la 15 linii consangvinizate și la hibrizii acestora cu soiul Galben timpuriu, s-a constatat că, în general, hibrizii conțin cantități mai mici de proteină totală și zeină decît ambii părinți. La o parte din hibrizi însă, proporția zeinei față de proteina totală este net inferioară celei din liniile consangvinizate corespunzătoare. Capacitatea anumitor linii consangvinizate de a da naștere la hibrizi cu o proporție mai scăzută de zeină ar putea servi ca mijloc practic de obținere a unor hibrizi de porumb cu o valoare biologică ridicată.

Creșterea conținutului în azot al bobului de porumb, realizabilă prin hibridări potrivite și prin selecție repetată, este asociată, de regulă, cu o creștere paralelă a conținutului în zeină [1], [2], [3], ceea ce nu duce la îmbunătățirea calitativă a proteinei porumbului.

Este bine cunoscut faptul ca valoarea biologică a proteinei porumbului depinde de proporția în care se găsește zeina, care, fiind o prolamină, are o valoare biologică redusă față de celelalte proteine cu valoare biologică superioară (albumine, globuline, gluteline).

Conținutul în proteină totală al boabelor de porumb, raportat la substanța uscată, este cuprins între 6,42 și 16,59% (în medie 12,6%), din care 40—50% reprezintă zeină [2], [4], [5].

Cercetări recente [2], [6], [7] au stabilit că în boabele porumbului homozigot pentru genele recesive „opaque-2" și „floury-2" se îmbunătățesc, comparativ cu porumbul normal, atît raportul gluteline : zeină, cît și conținutul în lizină al zeinei.

Cercetînd un material biologic autohton, ne-am propus să găsim unele posibilități de îmbunătățire calitativă a proteinei bobului de porumb prin hibridare.

MATERIAL ȘI METODE

Ca material de analiză s-au utilizat boabe de porumb de la 15 linii consangvinizate extrase din soiurile Galben timpuriu, Arieșan și populații locale, precum și de la hibrizii acestor linii cu soiul Galben timpuriu (tabela 1). Materialul a fost produs la Baza experimentală a Institutului agronomic „Dr. P. Groza" din Cluj. Din producția întregii parcele s-au obținut, prin metoda sferturilor, probele de analiză.

Azotul total s-a determinat prin metoda Kjeldahl, utilizînd o cantitate de 1 g făină proaspăt măcinată. Pentru calcularea conţinutului în proteină totală s-a aplicat factorul 6,25.

Tabela 1

Liniile mamă-consangvinizate şi hibrizii lor cu soiul Galben timpuriu (7—9)

Linia-mamă	Hibridul	Linia-mamă	Hibridul	Linia-mamă	Hibridul
211—212	569	124—126	555	13—14	725
58—60	724	457	690	392	678
303—305	659	40—41	546	280—281	597
22—24	727	122	554	408—409	686
318—320	661	25—27	728	274—276	584

Zeina s-a determinat după metoda lui Ermakov şi colab. [8], utilizînd o cantitate de 2 g făină proaspăt măcinată.

Toate determinările s-au făcut în dublu, calculîndu-se mediile respective. Valorile brute ale determinărilor s-au recalculat pentru un conţinut de 10% apă al materialului analizat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul hibrizilor în proteină totală (tabela 2) este, în majoritatea cazurilor, inferior atît liniilor consangvinizate, cît şi soiului tester. Acest fapt se evidenţiază şi mai bine din datele înscrise în tabela 3. Numai în două cazuri conţinutul în proteină totală al hibrizilor depăşeşte pe cel al liniilor consangvinizate corespunzătoare şi numai într-un singur caz pe cel al soiului tester.

Tabela 2

Conţinutul în proteină totală şi zeină al liniilor consangvinizate şi al hibrizilor lor cu soiul Galben timpuriu (în % din materialul cu 10% umiditate)

Linia-mamă	Hibridul	Conţinutul în proteină		Conţinutul în zeină	
		linia-mamă	hibridul	linia-mamă	hibridul
13—14	725	10,14	10,06	4,59	5,20
22—24	727	11,99	9,20	5,29	4,41
25—27	728	12,63	10,63	7,49	5,11
40—41	546	11,19	10,61	5,25	5,38
58—60	724	10,97	9,65	4,60	4,05
122	554	10,97	9,90	5,48	3,80
124—126	555	10,42	10,10	4,43	4,30
211—212	569	10,33	10,18	4,00	4,71
274—276	584	13,35	11,71	7,72	5,11
280—281	597	12,72	11,27	5,28	3,57
303—305	659	10,06	9,12	5,05	4,12
318—320	661	10,54	11,23	5,77	5,02
392	678	10,95	11,19	4,79	5,47
408—409	686	12,63	9,94	5,61	4,77
457	690	11,35	10,83	4,64	4,80
Soiul tester (7—9)		11,43		7,13	

Tabela 3

Procentul de zeină din proteina totală și procentul de proteină totală și de zeină al hibrizilor față de liniile consangvinizate corespunzătoare

Linia-mamă	Hibridul	Zeină din proteina totală (%)		Conținutul hibrizilor (% față de liniile consangvinizate corespunzătoare) în :	
		linia-mamă	hibridul	proteină totală	zeină
13—14	725	45,2	51,7	98,2	113,3
22—24	727	44,1	40,8	76,7	83,4
25—27	728	59,3	48,1	84,1	68,2
40—41	546	46,9	49,8	94,8	102,5
58—60	724	41,9	41,9	87,9	88,0
122	554	49,9	38,0	90,2	69,3
124—126	555	42,5	42,6	91,1	82,4
211—212	569	38,7	46,3	98,5	117,7
274—276	584	57,8	43,5	87,6	66,2
280—281	597	41,6	31,6	87,0	67,6
303—305	659	50,2	45,2	90,6	81,6
318—320	661	54,7	44,7	106,5	87,0
392	678	43,7	48,9	102,2	114,2
408—409	686	44,4	47,9	78,7	85,0
457	690	40,8	44,3	95,4	103,4
Soiul tester (7—9)		62,4		—	—

Se observă de asemenea o influență mai mare a formelor materne asupra conținutului în proteină totală al hibrizilor. Aceste rezultate concordă cu datele obținute de alți autori [9], care au lucrat pe un material biologic format din linii consangvinizate și hibrizi între linii consangvinizate, precum și cu cele semnalate de Jugenheimer [3].

Conținutul în zeină al hibrizilor este, în toate cazurile, inferior soiului tester și, în majoritatea cazurilor, inferior și liniilor consangvinizate. Se remarcă o mai mare variabilitate a conținutului în zeină la liniile consangvinizate (4,00—7,72%) decît la hibrizi (4,05—5,47%).

După cum rezultă din tabela 3, liniile 274—276, 122, 25—27, 280—281, 318—320, deși bogate în zeină, dau naștere unor hibrizi cu o proporție mult mai scăzută a acestui component față de proteina totală. S-ar părea, prin urmare, că anumite linii, provenite din soiuri și populații autohtone, sînt capabile să transmită la hibrizi un conținut mai scăzut în zeină, fără ca aceasta să afecteze prea mult conținutul în proteină totală.

Alte linii consangvinizate (211—212, 13—14, 392), dimpotrivă, dau naștere la hibrizi cu o proporție mai ridicată de zeină.

Capacitatea unor linii consangvinizate de a transmite la hibrizi o proporție mai scăzută a zeinei față de proteina totală ar putea primi o importanță practică în obținerea unor hibrizi de porumb mai valoroși din punct de vedere biologic, ca urmare a creșterii raportului dintre proteina totală și zeină.

Prezentat la redacție
la 18 iunie 1969

Catedra de biochimie
Institutul agronomic „Dr. P. Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. J. A. Boundy, J. H. Woychik, R. J. Dimler, J. S. Wall, Cereal chem., **44**, 160 (1967).
2. E. T. Mertz, O. E. Nelson, L. S. Bates, O. A. Veron, Advanc. Chem. Ser., **57**, 228 (1966).
3. R. W. Jugenheimer, *La sélection de maïs hybrides et la production de semences*, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Roma, 1959.
4. Tr. Săvulescu şi colab., *Porumbul. Studiu monografic*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1957, p. 138.
5. J. Mossé, J. Baudet, J. Landry, T. Moureaux, C. R. Acad. Sci., 263, seria D, 788 (1966).
6. S. A. Watson, K. R. Yahl, Cereal chem., **44**, 488 (1967).
7. O. E. Nelson, în Proceedings of the high lysine corn conference, Washington, 1966.
8. A. I. Ermakov, V. V. Arasimovici, M. I. Smirnova-Ikonnikova, I. K. Murri, *Metodi biohimiceskogo issledovaniia rastenii*, Selskohozizd., Moscova, Leningrad, 1952.
9. M. Ivănescu, *Cercetări chimice referitoare la proteinele bobului de porumb şi la modificările lor în fenomenul de heterozis*, teza de doctorat, Bucureşti, 1968.

TOTAL PROTEINE AND ZEIN CONTENT IN SEEDS OF SOME CORN HYBRIDS AS COMPARED TO THEIR GENITORS

SUMMARY

The determination of total protein and zein content in 15 corn inbreds and their hybrids with Galben timpuriu, demonstrates that, generally, hybrids contain smaller amounts of total protein and zein than the two genitors. However, some of these hybrids show a distinctly lower proportion of zein than the corresponding inbreds.

The capacity of some inbreds of giving birth to hybrids with a reduced proportion of zein might be considered as a means of obtaining corn hybrids having a better biological value.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 193 – 205 (1970)

REFERAT GENERAL

„ÎMBĂTRÎNESC" MACROMOLECULELE?

C. VELICAN

Proprietăţile fizico-chimice ale biopolimerilor sînt de o importanţă considerabilă în biologie şi medicină, macromoleculele fiind elementele structurale caracteristice materiei vii. Drept urmare, procesele fundamentale legate de metabolism, iritabilitate, reproducere şi diferenţiere se bazează pe interacţiuni ale macromoleculelor. Aceste interacţiuni implică faptul ca fiecare biopolimer să posede o organizare structurală adecvată particularităţilor sale funcţionale. Păstrarea acestei organizări structurale în condiţiile unei continue interacţiuni cu mediul înconjurător şi ale unei continue reînnoiri şi remodelări a componentelor macromoleculelor a fost considerată ca o manifestare a unui anumit grad de „autoprotecţie" a biopolimerilor şi denumită de noi „normostabilitate" [1], [2].

Trei grupe de factori asigură această normostabilitate, şi anume:

1) legăturile intramoleculare, intermoleculare şi dintre agregatele de macromolecule, determinînd o neutralizare a forţelor care tind să menţină izolate componentele constitutive ale macromoleculelor şi macromoleculele între ele;

2) substanţele ce alcătuiesc biopolimerul, natura lor, raportul cantitativ şi configuraţia sterică în arhitectura macromoleculei;

3) grupele ionizabile, grupele reactive, radicalii hidrofobi, tipul, numărul şi localizarea lor.

Adaptarea funcţională a factorilor structurali ai macromoleculelor, care creează normostabilitatea fiecărui biopolimer, este reflectată prin:

— echilibrul relativ dintre etapa anabolică şi cea catabolică a metabolismului atît al moleculelor constitutive, cît şi al macromoleculelor şi agregatelor macromoleculare;

— integrarea funcţiilor variate ale constituenţilor biopolimerului într-un sistem ierarhizat, ducînd la exercitarea exclusivă sau prevalentă a anumitor activităţi;

— anihilarea sau transformarea acţiunilor competitive în acţiuni de cooperare, permiţînd complexului să reacţioneze ca un întreg;

— dezvoltarea unor bariere structurale sau sterice care să limiteze accesibilitatea anumitor factori competitivi sau distructivi;

— crearea unei rigidităţi macromoleculare adaptate rezistenţei la stressurile mecanice;

— apariţia unei configuraţii sterice adecvate pentru funcţionarea de „centri activi", dotaţi cu proprietăţi enzimatice, hormonale sau imunologice, paralel cu instituirea unor mecanisme intrinsece de inhibare temporară a activităţii specifice a macromoleculelor, aşa cum există, de exemplu, la profermenţi.

Am propus, de asemenea, termenul de „hipostabilitate", pentru a desemna o scădere patologică a normostabilității structurale a biopolimerilor, și termenul de „hiperstabilitate", pentru a desemna o creștere patologică a acestei stabilități [1]—[3]. În sprijinul existenței unui nou mecanism patogenic al bolilor, bazat pe alterarea stabilității structurale a biopolimerilor, am demonstrat că anumiți complecși macromoleculari, în condițiile pierderii de substanțe constitutive, grupe reactive și sarcini electrice, devin susceptibili la extracții enzimatice și chimice față de care anterior erau rezistenți. Dimpotrivă, în condițiile introducerii de noi legături intra- și intermoleculare, de noi substanțe constitutive sau de noi grupe reactive, anumiți complecși macromoleculari devin rezistenți la extracții enzimatice și chimice față de care anterior erau susceptibili [4]—[7].

Analizînd aceste alterări ale stabilității structurale, ne-am pus în mod inevitabil întrebarea dacă anumite modificări ale macromoleculelor trebuie considerate ca patologice sau dacă ne găsim în prezența unor procese legate de îmbătrînirea organismului? Faptul că la bătrîni, în comparație cu tinerii, hemoglobina, de exemplu, prezintă o creștere a sarcinilor electrice negative și o scădere a capacității de disociere a oxigenului și de legare a cromului [8] permite oare să se afirme că respectiva macromoleculă a „îmbătrînit"? Există astăzi posibilitatea pentru biochimist să demonstreze că un biopolimer este tînăr sau bătrîn, așa cum se poate afirma despre un organism că este tînăr sau bătrîn?

Problema ni se pare de un interes practic considerabil, deoarece ea deschide biochimiei perspectiva de a fundamenta noi baze științifice medicinii preventive. Într-adevăr, se admite astăzi că apariția aterosclerozei, arteriosclerozei, sclerozelor cerebrale, otosclerozelor, osteoartrozelor, osteoporozelor, sclerozelor dermice, fibromiozitelor, cataractelor, emfizemului și a numeroase alte „infirmități" este strîns asociată cu procesul de îmbătrînire. Față de această impresionantă apariție de leziuni la nivelul celor mai variate țesuturi și organe, ne mai putem oare mulțumi cu afirmația că bătrînețea rezultă din acumulări de stressuri psihice și dezechilibre hormonale, fără a încerca să analizăm ce se petrece la nivelul macromoleculelor?

Întrucît cercetările noastre din cursul ultimilor ani s-au centrat în special asupra studiului organizării macromoleculare a țesutului conjunctiv, vom limita exemplificările la problema „îmbătrînirii" colagenului, domeniu în care avem o anumită experiență personală.

★

Pe baza datelor de biochimie, chimie-fizică și difractometrie, definim „colagen" o macromoleculă ce reprezintă aproximativ 30% din totalul proteinelor organismului omenesc, avînd o lungime de aproximativ 3 400 Å, o lățime de 14 Å și o greutate de aproximativ 300 000, precum și un conținut în aminoacizi caracterizat prin prezența hidroxiprolinei și hidroxilizinei, bogăția în glicină și secvențialitatea glicină-prolină-hidroxiprolină. Proprietățile acestei proteine fibroase par a fi foarte variate, aparent același tip de macromoleculă de colagen asigurînd rezistența la tracțiuni mecanice a tendoanelor, mineralizarea osului, capacitatea

viscoelastică a fibrelor de reticulină, permeabilitatea selectivă a membranelor bazale și transparența la lumină a corneei.

Cercetări de cromatografie au evidențiat în macromolecula de colagen două tipuri de lanțuri polipeptidice, după variațiile cantitative ale aminoacizilor constitutivi. Ele reprezintă monomerii și au fost denumite α_1 și α_2. Din conectarea lor prin legături transversale rezultă dimerii β ($\alpha_1 + \alpha_1 = \beta_{1,1}$; $\alpha_2 + \alpha_2 = \beta_{2,2}$; $\alpha_1 + \alpha_2 = \beta_{1,2}$). În sfîrșit, din unirea prin legături transversale a trei monomeri, iau naștere trimerii γ, reprezentînd forma matură, în general insolubilă, a agregatelor macromoleculare. Trecerea aceasta de la monomerii rapid solubili la dimerii mai greu solubili și apoi la trimerii insolubili este schematizată în figura 1 și constituie maturarea macromoleculei de colagen, proces peste care se va suprapune „îmbătrînirea". În figura 2 sînt prezentate formele de degradare a variatelor trepte de agregare macromoleculară, cu persistența anumitor legături intra- și intermoleculare în produșii solubilizați.

Lanțurile peptidice ale moleculei de colagen se formează în protoplasma fibroblaștilor și a altor tipuri de celule conjunctive. În interiorul unor mari agregate de ribozomi, aminoacizi heterogeni se leagă prin punți peptidice, așezîndu-se într-o secvență determinată, iar lanțul în întregime ia aspect de spirală. Din împletirea a trei astfel de spirale apare structura terțiară, respectiv macromolecula de tropocolagen, unitate care prin polimerizare va da naștere filamentelor, protofibrilelor, fibrilelor și fibrelor conjunctive. Legarea lanțurilor peptidice din aceeași macromoleculă, ca și între două macromolecule vecine, se face, în primul rînd, prin intermediul punților de hidrogen, între grupele CO și NH. Secundar apar și alte tipuri de legături electrovalente și, mai ales, covalente (amidice, ester, baze Schiff). Această formare continuă de legături reprezintă atît mecanismul prin care macromolecula de colagen își realizează gradul adecvat de normostabilitate structurală, cît și mecanismul prin care aceeași macromoleculă suferă o conversiune a normostabilității în hiperstabilitate, ca urmare a multiplicării anormale a legăturilor intermoleculare, apărînd procesul de „îmbătrînire".

Condițiile care favorizează această „îmbătrînire" sînt create de dispariția turnoverului metabolic în marea majoritate a macromoleculelor de colagen incluse în fibre, împiedicîndu-se astfel reînnoirea și remodelarea unităților constitutive ale macromoleculei. Devenită inertă din punct de vedere metabolic, macromolecula de colagen ar fi supusă interacțiunii întîmplătoare cu anumiți produși de metabolism ce acționează ca agenți de inducere a legăturilor încrucișate intermoleculare. Astfel ea suferă, în tot cursul vieții, un proces lent, asemănător celui din taninizarea industrială a pieilor, modificîndu-și particularitățile fizico-chimice și biologice și antrenînd apariția unei întregi patologii a vîrstei înaintate.

Se acceptă, în general, că proprietățile polimerilor sînt strîns legate de numărul, de distribuția și de tipul interconectărilor lanțurilor constitutive. Creșterea numărului legăturilor intermoleculare duce, în mod invariabil, la o densificare a stării solide, la reducerea spațiului dintre lanțurile polipeptidice și dintre macromolecule, precum și la blocarea reactivității grupărilor implicate în aceste legături. Rezultă o scădere a volumului specific, a capacității de hidratare, a reactivității chimice, a posibilității de pătrundere a solvenților, asociată cu o creștere a rezistenței

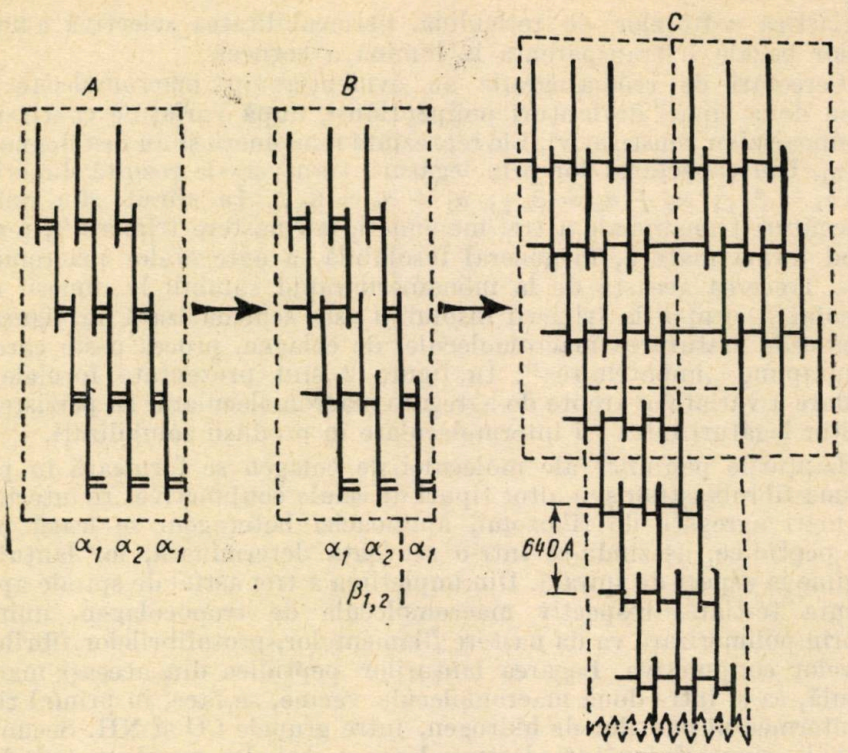


Fig. 1. — Procesul de „maturare" al unităților constitutive ale macromoleculei de colagen și al macromoleculelor înseși, proces a cărui amplificare nefiziologică duce la „îmbătrînirea" colagenului.

A — monomerii α_1 și α_2 ai macromoleculei, fără legături transversale între lanțurile polipeptidice, rezultînd forma cea mai puțin stabilă structural a colagenului; *B* — unirea monomerilor în dimeri prin legături transversale intramoleculare, ducînd la un anumit grad de stabilitate structurală a macromoleculei; *C* — unirea macromoleculelor prin legături transversale intermoleculare, rezultînd forma matură a colagenului, peste care se suprapune procesul de „îmbătrînire" (9).

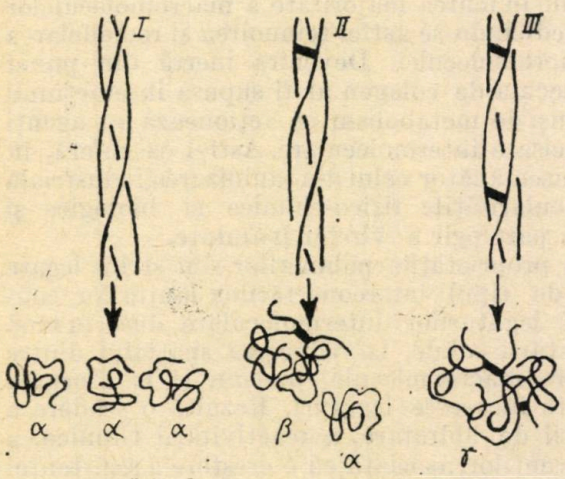


Fig. 2. — Prezentare schematică a descompunerii triplului helix din macromolecula de colagen în unitățile polipeptidice constitutive (monomerii α și dimerii β). Se constată absența interconectărilor între monomerii α, existența unei legături ce unește doi monomeri α în dimerul β și existența a două legături intramoleculare ce unesc dimerii β în trimerul γ [10].

mecanice. Toate aceste modificări ar caracteriza „îmbătrînirea" macromoleculei de colagen [9]—[16].

Posibilitatea înmulțirii progresive a legăturilor încrucișate dintre macromoleculele de colagen, prin acțiuni întîmplătoare ale unor agenți dotați cu capacitatea de a forma aceste interconectări, a căpătat un interes mai deosebit o dată cu studiul alcaptonuriilor. La acești bolnavi avînd un defect ereditar în metabolismul tirozinei, se acumulează în organism acidul homogentizinic, care acționează ca factor de multiplicare a legăturilor intermoleculare în fibrele de colagen, favorizînd dezvoltarea sclerozelor viscerale [11], [12]. Reacția colagenului cu monomerul neoxidat al acestui acid pare a fi ușor reversibilă. Dacă însă acidul homogentizinic suferă o oxidare, iau naștere polimeri ce se leagă ireversibil de macromolecula de colagen, producînd un proces de „taninizare" *in vivo* [17].

Plecînd de la aceste constatări, s-a investigat dacă nu există și în condiții fiziologice astfel de agenți capabili de a produce „îmbătrînirea" colagenului. Dintre sutele de substanțe testate pînă acum, numai aldehidele alifatice s-au dovedit capabile, *in vitro*, să interconecteze macromoleculele din fibre. Toți ceilalți nenumărați intermediari ai metabolismelor glucidic, protidic și lipidic au apărut ineficienți din acest punct de vedere, cel puțin în condițiile de testare respective.

Investigații analitice au demonstrat că pentru a „îmbătrîni" macromolecula de colagen, prin creșterea anormală a numărului legăturilor intermoleculare, produsul de metabolism intermediar trebuie să posede, în afara grupărilor aldehidice, și următoarele particularități sterice și chimice: a) un grup formil terminal; b) absența unei substituții care să atragă electroni la nivelul carbonului α (tip C = C; CHOH; C = O); c) atomul de carbon să fie legat de un lanț alifatic care să nu posede mai mult de un singur atom de carbon adițional; d) să existe un atom de hidrogen terminal [10]. Aceste particularități sînt schematizate în figura 3. În sfîrșit, spre a putea pătrunde prin spațiul extrem de redus dintre două lanțuri polipeptidice ale macromoleculei de colagen, agentul producător de legături încrucișate trebuie să posede cea mai simplă configurație sterică posibilă, respectiv cel mult 4 atomi de carbon sau în total 6—7 Å. Sub-

MONOALDEHIDE:

$$H-C-R-CHO$$

$R = C_1 = CHOH,\ C=O,\ C=C$ și $\neq CH_2$

DIALDEHIDE:

$$OHC-R-CHO$$

$R \leqq C_3$ sau $(CH_2-O-CH_2)_3$

Fig. 3. — Particularitățile structurale necesare aldehidelor pentru a da naștere la legături încrucișate [15].

stituirea lanțului alifatic printr-un nucleu aromatic a dus în mod constant la pierderea capacității de a forma legături intermoleculare.

Pe baza datelor menționate, sînt de luat în considerație, ca agenți potențiali de „îmbătrînire" a macromoleculei de colagen, ca urmare a formării unor legături intermoleculare suplimentare, aldehida glicerică și aldehida piruvică din metabolismul glucidic, acroleina și aldehida cro-

tonică din metabolismul lipidic, aldehida glicolică din metabolismul protidic. Interrelațiile metabolice ale acestor substanțe sînt schematizate în figura 4 [15]. S-au mai incriminat și anumiți derivați dialdehidici din ciclul Krebs, care pot acționa numai dacă au două grupări formil terminale și un lanț alifatic. În ceea ce privește aldehida propionică, ca și aldehidele alifatice și nealifatice cu greutate moleculară mare și toate aldehidele aromatice, nu se semnalează pînă acum decît rezultate negative. Menționăm, de asemenea, un anumit interes acordat chinonelor, considerate capabile a produce legături încrucișate mai rezistente decît cele

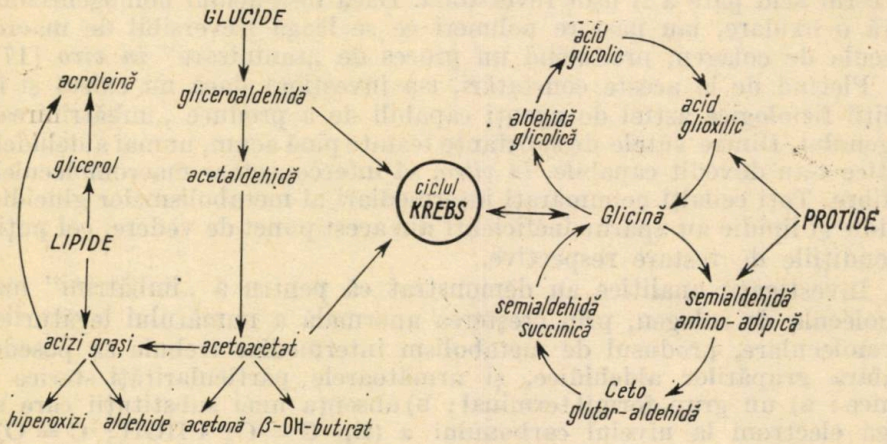


Fig. 4. — Interrelația, în metabolismul lipidelor, glucidelor și protidelor, a agenților aldehidici potențiali ce produc legături încrucișate între lanțurile polipeptidice ale colagenului. Cei mai importanți agenți din acest punct de vedere par a fi acroleina, gliceroaldehida acetaldehida și cetoglutar-aldehida [15].

rezultate din acțiunea aldehidelor. Trebuie însă subliniat că, din punct de vedere experimental, singurele date care merită a fi reținute sînt cele referitoare la posibilitatea de a produce o scleroză a peretelui arterial al cîinilor, amintind de stadiile incipiente ale aterosclerozei, după administrare de aldehidă glicerică și de acroleină [18].

În ceea ce privește mecanismul intim de acțiune al agenților producători de legături încrucișate, el este în parte schematizat în figurile 5 și 6 [10], [15]. Studiile analitice efectuate în acest domeniu au evidențiat, mai întîi, apariția unui derivat aminometilol ($-NH-CH_2-OH$) al aminelor primare sau secundare. Se formează astfel o grupare OH extrem de reactivă, aptă de a reacționa rapid cu un atom de hidrogen. Apa este eliminată în cursul acestei reacții și ia naștere o punte metilenică ($R-NH-CH_2-NH-R'$). Compușii ce rezultă ca urmare a formării acestui tip de legătură încrucișată ($R-NH-CH_2-NR'-CH_2-NHR''$) se caracterizează printr-o creștere a rezistenței la stressuri mecanice și la presiuni exterioare. Dialdehidele pot forma atît punți de metilen, cît și baze Schiff la ambele capete ale moleculei. În acest sens, gruparea formil de la un capăt reacționează cu o grupare amino din lanțul polipeptidic al unei macromolecule de colagen, în timp ce capătul opus al moleculei de meta-

bolit intermediar se leagă de o altă grupare amino a unui lanț polipeptidic aparținînd altei macromolecule de colagen. Se formează astfel o legătură intermoleculară, rezultînd un complex cu următoarea structură generală : $R_1N-C-R_0-C-NR_2$. Grupările cele mai reactive ale colagenului pentru astfel de reacții ar fi cel epsilon-amino a lizinei și cele ceto-imidice. În plus a fost implicat și radicalul amino al hidroxilizinei, argininei, glutaminei, asparaginei, precum și radicalul hidroxil al hidroxiprolinei [10], [15]. Recent s-a mai evidențiat un compus ninhidrin-pozitiv, cu particularitățile cromatografice ale epsilon-N-metilhidroxilizinei, care a fost de asemenea implicat în formarea legăturilor încrucișate [19].

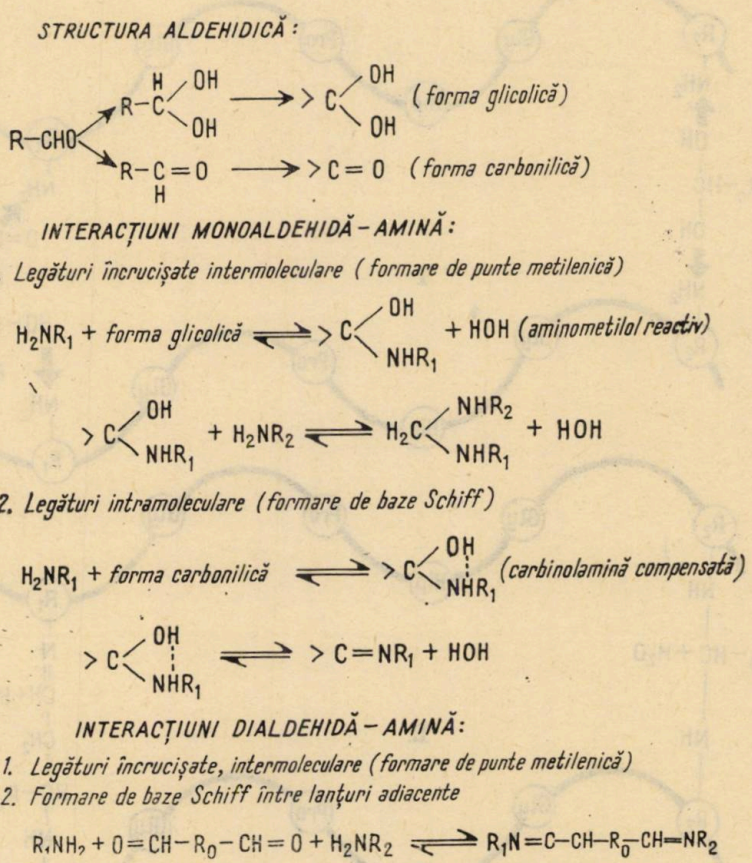


Fig. 5. — Mecanismul probabil prin care monoaldehidele alifatice și anumite dialdehide ar forma legături încrucișate [10].

Se sugerează că acest proces de „taninizare" *in vivo* a colagenului s-ar desfășura în două etape : prima ar fi o modificare intramoleculară, cu ruperea legăturilor dintre lanțurile polipeptidice de către metaboliții aldehidici, urmată de eliberarea grupelor reactive ; a doua s-ar limita la formarea de legături încrucișate intermoleculare, în cursul căreia alde-

hidele reacţionează cu grupările astfel eliberate. Intensitatea acestui proces este guvernată nu numai de cantitatea de metabolit intermediar şi de numărul grupărilor reactive ale colagenului, ci şi de densitatea legăturilor intra- şi intermoleculare preexistente şi, probabil, de asemenea, de gradul de polimerizare a substanţei fundamentale interfibrilare. Totuşi,

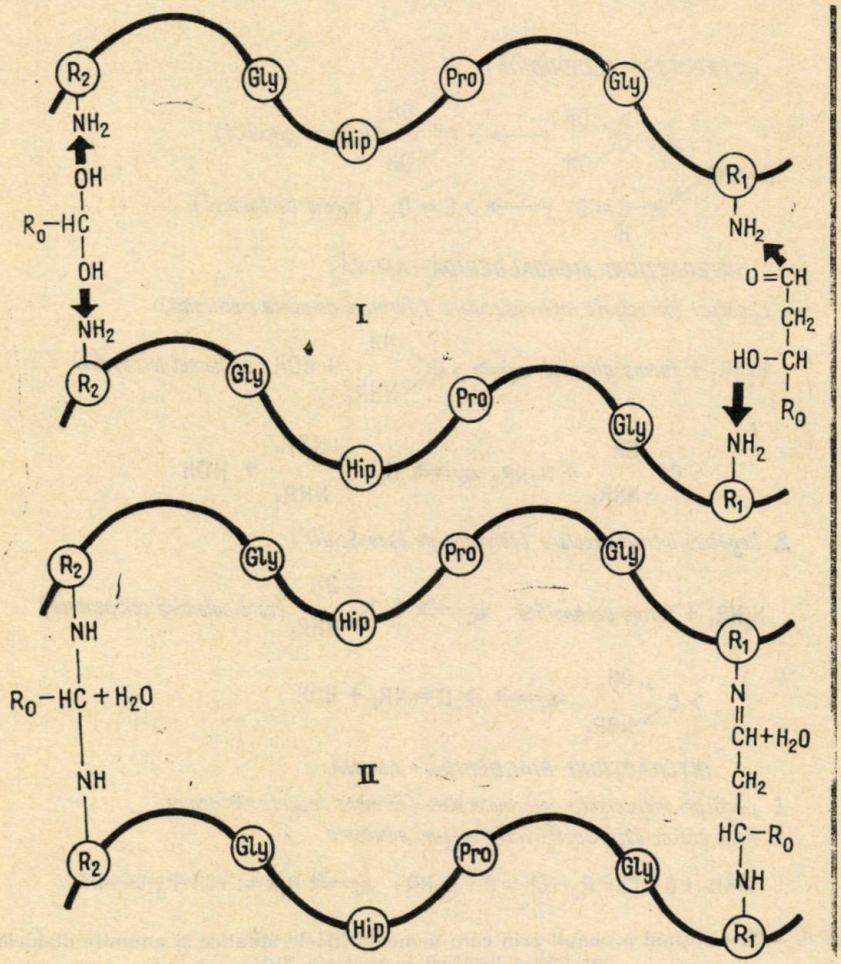


Fig. 6. — Prezentare schematică a celor două etape ale interacţiunii dintre aldehide şi lanţul polipeptidic al colagenului, conţinînd ca acizi aminaţi glicina (Gly), hidroxiprolina (Hip) şi prolina (Pro). *I* — faza de interreacţie; *II* — faza de formare a legăturilor covalente între două lanţuri polipeptidice alăturate [15].

în anumite condiţii, factorul cantitate devine predominant, aşa cum se întîmplă, de exemplu, în diabetul necontrolat şi netratat, cînd abundenţa de corpi cetogeni „îmbătrîneşte" rapid numeroase macromolecule de colagen, proces reflectat de frecvenţa apariţiei sclerozelor vasculare, renale, oculare etc. [12]. Pe baza aceluiaşi proces întîmplător, legat de

anumite particularităţi metabolice, se încearcă să se explice şi unele deosebiri în ritmul de îmbătrînire a diferitelor specii, precum şi durata mai scurtă sau mai lungă a mediei de viaţă. În sfîrşit, tot pe baza aceluiaşi proces întîmplător de interconectare a macromoleculelor de colagen prin agenţi de formare a legăturilor încrucişate, se încearcă să se explice alterările morfologice de vîrstă ale ţesutului conjunctiv, reflectate prin tendinţa continuă la deshidratare, prin fragmentarea fibrelor elastice şi colagene, prin aşa-zisa colagenizare a fibrelor reticulinice şi a membranelor bazale, prin reducerea cantitativă a substanţei fundamentale şi creşterea raportului colagen/mucopolizaharide, ca şi prin scăderea progresivă a digestibilităţii la colagenază a colagenului din fibre [13], [20]—[24].

Un alt factor care ar favoriza înmulţirea numărului de legături intermoleculare şi, implicit, procesul de „îmbătrînire" a colagenului ar fi retracţia termodinamică a reţelelor biopolimerului. Conform acestei teorii [25], „îmbătrînirea" ar rezulta dintr-o modificare structurală spontană de origine termodinamică, datorată forţei de retracţie a biopolimerului în direcţia minimei energii libere. În acest sens apar o reducere progresivă a zonelor, aşa-zise amorfe, de la capetele macromoleculei, bogate în aminoacizi polari, şi o creştere progresivă a gradului de cristalinitate din zonele unde predomină aminoacizii apolari. Această continuă clarificare a ordinii intramacromoleculare o dată cu înaintarea în vîrstă apare evident la studiile difractometrice, constatîndu-se, de exemplu, că la şobolanul în stadiul embrionar cristalinitatea reprezintă doar 9,1% din totalul macromoleculei de colagen, iar la şobolanul adult 18,1% [25]. În cursul acestui proces de retracţie spontană, dependent ca intensitate de lungimea şi numărul lanţurilor polipeptidice din zonele periferice ale macromoleculei de colagen, apar următoarele modificări mai importante : deshidratarea lanţurilor ce se contractă, cu mărirea densităţii structurale a macromoleculei respective ; apropierea grupărilor reactive ale lanţurilor polipeptidice la distanţe care permit interconectarea lor directă, rezultînd noi legături intra- şi intermoleculare. S-a calculat că parametrii termodinamici sînt favorabili în astfel de condiţii în special pentru formarea punţilor de hidrogen, necesitînd o energie liberă de aproximativ 0,6 kcal/ /mol, la 27°C [26]. Faptul că procesul de contracţie termică a colagenului, utilizat extrem de mult ca test al densităţii legăturilor încrucişate, are loc la temperaturi progresiv mai ridicate cu cît organismul înaintează în vîrstă sugerează că tot mai numeroase punţi de hidrogen apar în zona cristalină a macromoleculei. Grupul cel mai des implicat în formarea acestor interconectări, ca rezultat al retracţiei termodinamice, ar fi hidroxilul hidroxiprolinei. În sprijinul acestei supoziţii ar pleda observaţia că procesul de contracţie termică apare la o temperatură cu atît mai ridicată, cu cît conţinutul în hidroxiprolină al colagenului este mai mare [27]. Deşi prin creşterea gradului de cristalinitate macromolecula devine mai rezistentă la stressuri mecanice, cîştigînd un plus de rigiditate, ea este în acelaşi timp mai puţin adaptabilă la interacţiunile cu mediul înconjurător, mai ales în ceea ce priveşte variaţiile de pH şi de concentraţie ionică. S-a afirmat, în termeni mai mult sau mai puţin poetici, că acest caracter cristalin rigid al macromoleculei de colagen, „îmbătrînită" prin creşterea numărului legăturilor intra- şi intermoleculare, ar reprezenta

„călcîiul lui Ahile" în condiţii inadecvate de mediu [16]. În special coborîrea pH-ului local ar fi urmată de transformarea stării cristaline în stare amorfă, ducînd la dizolvarea macromoleculei şi, respectiv, la pierderea capacităţilor mecanice ale fibrelor. Această alterare ar apărea în special în zonele supuse la stressuri repetate, cum ar fi valvulele cardiace, cordajele tendoanelor, capsulele articulaţiilor, pereţii arterelor. De asemenea, unele molecule mici, de tipul bazelor şi al acizilor slabi, pot acţiona în acelaşi sens de degradare a structurii cristaline a macromoleculei de colagen. Se încearcă astfel să se explice modul de apariţie a numeroase leziuni cu caracter distructiv, care se suprapun cronologic procesului de îmbătrînire a organismului [16].

Un alt factor implicat a produce „îmbătrînirea" macromoleculelor de colagen prin înmulţirea numărului legăturilor intermoleculare este reprezentat de radiaţii.

Pe primul plan trebuie luate în consideraţie efectele razelor ultraviolete, dată fiind expunerea fiecărui organism la acest tip de radiaţii o dată cu expunerea lui la lumina solară. Cercetările în acest domeniu tind să demonstreze că efectul de „îmbătrînire" ar fi secundar acţiunii lipidelor nesaturate. Aceste substanţe, sub acţiunea radiaţiilor, dau naştere la produşi de oxidare bogaţi în grupări aldehidice, care „taninizează" în special colagenul din pielea expusă razelor solare [28].

Razele X produc înmulţiri şi mai nete ale legăturilor încrucişate dintre macromoleculele de colagen, frecvenţa sclerozelor postradioterapice fiind un argument de o incontestabilă valoare ştiinţifică. Efectele apar cu atît mai nete cu cît ţesutul conjunctiv respectiv conţine fibre cu macromolecule mai sărace în legături intermoleculare şi cu cît durata iradierii se prelungeşte. S-a putut demonstra pe tendonul de şobolan că o singură radiaţie poate mări de la 1 la 36 numărul de legături încrucişate dintr-o macromoleculă de colagen cu greutate de aproximativ 360 000 [29]. Ca urmare a acestui proces, tendonul devine rigid, fiind alcătuit din unităţi cu un mare grad de cristalinitate. Acest efect al iradiaţiilor apare numai dacă ţesutul conjunctiv este intens imbibat cu apă. Dimpotrivă, pe un tendon uscat, aceeaşi cantitate de raze X produce o degradare masivă a fibrelor, sugerînd că pe lîngă efectul direct al trecerii electronilor, intervine hotărîtor energia primită prin transfer de la procesul de radioliză a apei. Deşi necesitatea prezenţei apei pentru apariţia legăturilor intermoleculare induse prin radiaţii a apărut constant în toate lucrările, mecanismul intim de acţiune este încă puţin cercetat. S-au sugerat reagregări ale macromoleculelor, cu formarea de noi punţi de hidrogen, apariţia de legături covalente între reziduuri aromatice de tipul tirozinei şi fenilalaninei, conectări de tip C—C la nivelul aminoacizilor polari din zonele amorfe ale macromoleculei de colagen etc. [30].

★

Existenţa unui mecanism de „îmbătrînire" a macromoleculei de colagen prin înmulţirea legăturilor intermoleculare este o realitate ştiinţifică bine documentată de anumite studii experimentale şi observaţii clinice. Este însă surprinzătoare uşurinţa cu care unii autori reduc o problemă atît de complexă pe plan biologic, ca aceea a îmbătrînirii, la o simplă creştere numerică a legăturilor intermoleculare, şi aceasta evi-

denţiată aproape în exclusivitate la nivelul tendonului cozii de şobolan. S-au propus şi teste de determinare a gradului de îmbătrînire, fie prin constatarea rezistenţei la solubilizare, care creşte paralel cu numărul conectărilor intermoleculare [14], fie prin evidenţierea raportului cantitativ dintre monomerii α şi dimerii β, raport care scade cu cît se înmulţesc aceste interconectări [31]. Fără a diminua valoarea cercetărilor care încearcă să demonstreze că molecula de colagen poate „îmbătrîni", considerăm, ca şi alţi autori [23], că bătrîneţea nu poate fi simplificată pînă la un „by-product" al ciclului Krebs sau al altui ciclu metabolic. Ea rezultă dintr-o acumulare de variate „agresiuni", acţionînd atît asupra celulelor, cît şi asupra spaţiilor extracelulare, care duc în timp la alterarea funcţională a organelor şi a ţesuturilor. În acest proces extrem de complex, acumularea de molecule nelabile din punct de vedere metabolic, atît în protoplasme, cît şi în afara lor, reprezintă unul dintre mecanismele care trebuie să reţină atenţia cercetătorilor. La aceasta se adaugă scăderea intensităţii oxigenării ţesuturilor, blocarea eliminării unor produşi de metabolism, anumite insuficienţe hormonale, anumite alterări în metabolismul sistemului nervos central etc. etc. La nivel macromolecular sînt de luat în consideraţie nu numai înmulţirea legăturilor intermoleculare, ci şi variate procese de dezaminare şi decarboxilare, amidări, reduceri ale punţilor disulfidice, oxidări de radicali sulfhidril, deplieri ale spiralelor polipeptidice [8]. Această complexitate de procese ce se suprapun mai mult sau mai puţin net etapelor cronologice ale evoluţiei ontogenetice face ca trecerea între ceea ce este tînăr şi bătrîn, respectiv momentul în care se poate afirma că modificările de vîrstă afectează particularităţile fizico-chimice şi activitatea fiziologică a macromoleculelor, să fie extrem de greu de delimitat.

Revenind la subiectul dominant al acestei prezentări, legăturile încrucişate intermoleculare, momentul în care numărul lor devine un test de „îmbătrînire" a macromoleculei respective va trebui să nu mai fie dependent de metodologia utilizată şi de modul de interpretare al cercetătorului respectiv, aşa cum apare în prezent. Dar, chiar în aceste condiţii, rezultatele au o valoare limitată la ţesutul testat, deoarece, de exemplu la şobolani, femelele cu sarcini repetate au un ţesut conjunctiv mult mai „bătrîn" în comparaţie cu masculii de aceeaşi vîrstă [32]. De asemenea, s-a constatat că modificările de vîrstă apar mult mai puţin nete în ţesutul conjunctiv, dacă animalul a fost în prealabil castrat [33].

În plus, nu s-a putut demonstra pînă acum că fiecare organ şi ţesut îşi măresc progresiv cu vîrsta numărul de legături dintre macromoleculele de colagen. În numeroase testări s-a constatat că acest număr nu se mai modifică după ce perioada de creştere a organismului a încetat, iar în anumite teritorii înmulţirea legăturilor alternează cu zone în care se evidenţiază o netă scădere a lor [34]. Cercetări recente ne-au permis să demonstrăm că zonele din pereţii arteriali, cele mai susceptibile la dezvoltarea leziunilor de ateroscleroză, prezintă gradul cel mai redus de maturare a ţesutului conjunctiv [7]. O problemă care merită să reţină atenţia este aceea a precizării dacă, în condiţiile evidenţierii unui număr crescut de legături intermoleculare, ne găsim în prezenţa unor macromolecule sintetizate cu ani în urmă şi care au devenit inerte din punct de vedere metabolic sau în prezenţa unui colagen sintetizat de celule

„îmbătrînite" şi care are capacitatea de a forma mai rapid şi mai masiv interconectări macromoleculare? Anumite investigaţii în acest domeniu tind să demonstreze că, într-adevăr, „îmbătrînesc" vechile macromolecule, aparent fără turnover, şi că la bătrîni nu s-ar sintetiza un tip special de colagen [35].

Ipoteza îmbătrînirii organismului prin înmulţirea anormală a legăturilor intermoleculare, extinsă şi la nivelul acizilor dezoxiribonucleici şi al altor proteine, a sugerat şi încercări de terapeutică. Astfel, s-a recomandat o reducere a aportului de calorii şi a ingerării anumitor proteine al căror metabolism ar da naştere la acizi dibazici şi la alţi produşi intermediari de degradare. O altă linie de tratament sugerează mărirea în organism a substanţelor capabile a reacţiona rapid cu radicalii liberi, fără a face şi legături intermoleculare în fibrele de colagen. S-au utilizat în acest sens cisteina, 2-mercaptoetilamina, hidroxilamina etc. La şoarece, administrarea acestei terapeutici ar fi prelungit cu aproximativ 25% durata medie a vieţii [36]. În sfîrşit, o altă linie terapeutică se adresează utilizării de agenţi latirogeni, în doze considerate netoxice pentru adult [37], cunoscîndu-se acţiunea lor blocantă asupra formării legăturilor intermoleculare ale colagenului. Numeroase date experimentale au demonstrat că aceşti agenţi latirogeni, şi în special beta-aminopropionitrilul, împiedică monomerii α să se unească în dimeri β şi dimerii β să alcătuiască trimeri γ, după tipul prezentat în figura 1 [38], [39]. Plecînd de la aceste date, s-a preconizat o profilaxie a bătrîneţii prin administrarea continuă şi în cantităţi netoxice de agenţi latirogeni [37], pe baza constatării că este mai uşor să previi formarea unei legături intermoleculare decît să o rupi după ce s-a format. Găsirea şi a altor agenţi cu efect „anti cross-linked", asemănător aceluia al substanţelor latirogene, rămîne un cîmp deschis de investigaţie.

În încheierea acestei lucrări, insistînd încă o dată asupra faptului că mecanismul complex de îmbătrînire a organismului nu trebuie limitat în întregime la mecanismul extrem de simplu al înmulţirii legăturilor încrucişate dintre macromoleculele de colagen, subliniem importanţa acestor studii care caută să evidenţieze cum şi în ce măsură modificările de vîrstă afectează proprietăţile fizico-chimice şi activitatea biologică a anumitor macromolecule.

Prezentat la redacţie
la 14 ianuarie 1969

Institutul de medicină internă
„Dr. N. Gh. Lupu"
Academia de ştiinţe medicale

BIBLIOGRAFIE

1. C. Velican, D. Velican St. cerc. med. int., **8**, 113 (1967).
2. C. Velican, D. Velican, Biochim. Biol. sper., **6**, 1 (1967).
3. C. Velican, D. Velican, *Histochemical attempts to analyse the structural stability of macromolecular aggregates*, Third Intern. Congress Histochem. Cytochem., Springer Verlag, New York, 1968, p. 280.
4. D. Velican, C. Velican, Nature (Lond.), **215**, 882 (1967).
5. C. Velican, D. Velican, Virchows Arch., Abt. B, **1**, 297 (1968).
6. C. Velican, Acta histochem., **31**, 261 (1968).
7. C. Velican, J. Atheroscler. Res., **9**, (1969) 315.

8. H. Walter, Nature (Lond.), **198**, 189 (1963).
9. P. M. Gallop, *Concerning some special structural features of the collagen molecule. Connective Tissue, Intercellular Macromolecules*, Churchill, Londra, 1964, p. 79.
10. R. A. Milch, Gerontologia, **7**, 129 (1963).
11. J. Bjorksten, J. amer. Geriat. Soc., **6**, 740 (1958).
12. J. Bjorksten, J. amer. Geriat. Soc., **10**, 125 (1965).
13. F. Verzar, Helv. physiol. pharmacol. Acta, **14**, 207 (1956).
14. F. Verzar, Gerontologia, **4**, 104 (1960).
15. R. A. Milch, J. South Med. Ass., **58**, 11 (1965).
16. C. D. Nordschow, Exp. molec. Path., **5**, 350 (1965).
17. Z. Trnavska, Kozarstvi, **15**, 257 (1965).
18. R. A. Milch, J. R. Jude, J. Knaack, Surgery, **54**, 104 (1963).
19. Z. Deyl, J. Rosmus, Exp. Geront., **2**, 97 (1967).
20. H. Sobel, S. Gabay, T. E. Wright, I. Lichtenstein, N. H. Nelson, J. Geront., **13**, 128 (1958).
21. J. W. Lash, N. W. Whitehoure, Arch. Biochem. Biophys., **90**, 159 (1960).
22. L. Anon, Chem. Eng., **40**, 104, 138 (1962).
23. M. Chvapil, Z. Deyl, Gerontologia, **10**, 199 (1964/1965).
24. R. A. Milch, Monogr. Surg. Sci., **2**, 261 (1965).
25. G. I. Fels, Gerontologia, **12**, 109 (1966).
26. H. A. Scherga, *Intramolecular bonds in proteins. The Proteins*, Academic Press, New York, 1963, p. 542.
27. K. H. Gustavson, *Chemistry and reactivity of collagen*, Academic Press, New York, 1956.
28. J. Bjorksten, T. Collbring, Proc. Sci. Sect. Toil. Goods Assoc., **42**, 1 (1964).
29. A. J. Bailey, Gelatine and Glue Res. Assoc., **34**, 1 (1964).
30. A. J. Bailey, W. J. Tromans, Radiat. Res., **23**, 145 (1964).
31. E. Heikkinen, E. Kulonen, Experientia, **20**, 310 (1964).
32. A. Arvay, J. Takacs, F. Verzar, Gerontologia, **7**, 77 (1963).
33. Z. Hruza, M. Chvapil, V. Kobrle, Physiol. Bohem., **10**, 290 (1961).
34. G. L. Eichhorn, J. J. Butzow, Coll. Curr., **7**, 235 (1966).
35. Z. Hruza, V. Hlavackova, Gerontologia, **7**, 225 (1963).
36. D. Harman, Experientia, **18**, 473 (1962).
37. F. S. Labella, Gerontology, **6**, 47 (1966).
38. G. R. Martin, J. Gross, K. A. Piez, M. S. Lewis, Biochim. biophys. Acta, **53**, 599 (1961).
39. G. R. Martin, K. A. Piez, M. S. Lewis, Biochim. biophys. Acta, **69**, 472 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 2, 207 – 213 (1970)

ROLF E. DOHRMANN, β-*Glucuronidase*, sub redacția R. HEGGLIN, F. LEUTHARDT, R. SCHOEN, H. SCHWIEGK, A. STUDER, H. U. ZOLLINGER, Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg–New York, 1969.

Această lucrare a apărut recent în limba germană, ca vol. 28 al periodicului „Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik". Ea coordonează cercetările existente în legătură cu β-glucuronidaza, enzimă larg răspîndită în organism, cu acțiuni multiple (hidrolază, sintetază, transferază) și importantă din punct de vedere biochimic și clinic, pentru stabilirea prognozei și diagnosticului într-o serie de afecțiuni.

Cartea cuprinde 84 de pagini, cu 18 capitole. În introducere se face un istoric, adus la zi, în legătură cu β-glucuronidaza. În cuprins se ating o diversitate de aspecte legate de existența acestei enzime, ca funcție, activatori și inhibitori, determinarea activității (metode de dozare) localizarea pe diferite țesuturi, organe, în plasmă, ser și elemente figurate ale sîngelui; legătura dintre β-glucuronidază și coagularea sîngelui, comportarea ei în afecțiunile hepatice, diabet, arterioscleroză, sub influența hormonilor feminini și masculini; relațiile cu sistemul nervos; prezența ei în secreții și excreții; comportarea la radiații; acțiunea unor medicamente asupra activității etc.

Cartea are o bogată bibliografie (329 de indicații) și este ilustrată cu 26 de grafice, figuri, scheme, tabele. Ea se adresează și este utilă medicilor, fiziopatologilor, biologilor și biochimiștilor de clinică.

Viorica Eleferescu-Frunzeti
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

G. N. COHEN, *The Regulation of Cell Metabolism* (Reglarea metabolismului celular), Holt, Rinehart & Winston, Inc., New York; Hermann, Paris, 1968.

În lucrarea de față, aparținînd ciclului „Molecular and Cellular Biology series", autorul prezintă unele aspecte ale metabolisnului celular și ale reglării acestuia.

Ca exemplificare pentru diferitele faze ale metabolismului, autorul alege microorganismele, pe de o parte ținînd seama de experiența pe care o are în acest domeniu, iar pe de altă parte pentru că studiul metabolismului este mult simplificat în cazul organismelor unicelulare, prin inexistența influenței celorlalte celule sau organe prezente în cazul organismelor pluricelulare.

Ținînd seama de multitudinea compușilor sintetizați în celulă și de posibilitățile variate de a regla sinteza lor, întregul material (226 p.) a fost împărțit în 19 capitole. În primele

capitole sînt prezentate cîteva probleme de interes general privind enzimele bacteriene, reglarea activităţii enzimatice. Sînt analizate şi căile metabolice mai importante din celulă : glicoliza şi reglarea ei, ciclul acizilor tricarboxilici, gluconeogeneza, biosinteza lipidelor. Un capitol al lucrării se ocupă de metodele de studiu ale căilor metabolice şi de controlul sintezei enzimatice. În cotinuare, se analizează reglarea biosintezei unor anumite categorii de substanţe : aminoacizi, nucleotide şi dezoxinucleotide pirimidinice şi purinice, vitamine, steroli, cicluri tetrapirolice, fiecare dintre acestea constituind tema unui capitol.

Bazat pe o documentare bogată (366 de referinţe) şi la zi, autorul prezintă materialul abundent şi complex din acest domeniu într-o formă concisă şi logică. La aceasta concură schemele de reacţie, deosebit de edificatoare, tabelele şi figurile.

Olguţa Macovschi
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Quantitative Biology of Metabolism (Biologia cantitativă a metabolismului), al III-lea Simpozion internaţional, Institutul biologic Helgoland, 26—29 septembrie 1967, sub redacţia A. LOCKER, Springe rVerlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 296 p.

Organizatorii acestui simpozion au fost A. Locker şi F. Krüger. După cuvîntul de deschidere al lui O. Kinne şi prefaţa redactată de A. Locker, volumul redă 40 de comunicări (din care două prezentate de cercetători români), împărţite în 5 secţiuni :

1. Modele ale metabolismului (10 comunicări), cu 4 subsecţii : modele în general, modele discrete şi continue, modele stohastice şi deterministe, modele cibernetice ale metabolismului celular.

2. Parametri metabolici (12 comunicări), cu 3 subsecţii : temperatură-anotimp-adaptare, creştere-vîrstă, mediul celular-influenţe experimentale.

3. Deteriorarea metabolismului (6 comunicări), cu 3 subsecţii : deteriorarea datorită iradierii, deteriorarea compuşilor radiolitici sau toxici, deteriorarea datorită lipsei oxigenului.

4. Controlul metabolic (11 comunicări), cu 5 subsecţii : control metabolic şi optimizare, control metabolic la nivel celular, control la nivel sistemic, control şi sistemul nervos central, termoreglarea.

5. Concluzii pe marginea simpozionului (A. Locker).

Lucrările prezentate folosesc un bogat material ilustrativ (fotografii, grafice, scheme). Pentru fiecare lucrare sînt prezentate bibliografia, rezumatul şi discuţiile ce au avut loc în cadrul simpozionului pe marginea ei. Volumul se încheie cu un index de subiecte şi de autori.

Considerăm că prin aspectele teoretice tratate lucrările sînt preţioase atît pentru fiziologi, cît şi pentru biochimişti.

Florin Mihăilescu
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

MARIA WOLLEMANN, *Métabolisme des médiateurs chimiques du système nerveux* (Metabolismul mediatorilor chimici ai sistemului nervos), Masson et Cie, Paris; Akademiai Kiadó, Budapesta, 1970, cu o prefață de dr. H. Laborit, 162 p. 47 figuri, 13 tabele și 747 indicații bibliografice.

Cartea are o introducere și cuprinde două părți. În introducere se face un scurt istoric al neurochimiei și al substanțelor mediatoare.

În prima parte, care cuprinde 6 capitole, se tratează metabolismul fiziologic al mediatorilor și inhibiția lor de către agenții farmacologici.

Capitolele I—III se ocupă de localizarea, degradarea, eliberarea și rolul acetilcolinei, catecolaminei și serotoninei în sistemul nervos central și periferic și, de asemenea, de colinesterază și izoenzimele sale, precum și de inhibitorii acestei enzime.

Capitolul IV tratează despre efectul derivaților fenotiazinici asupra glicolizei, asupra fosforilării oxidative, asupra enzimelor participante la aceste procese și asupra încorporării fosforului, acetatului și lipidelor în creier. Se explică, de asemenea, mecanismul de inhibare a activității enzimatice, ca și metabolismul și localizarea fenotiazinelor în organism.

În capitolul V se descriu sinteza, degradarea și localizarea histaminei, substanței P (o polipeptidă bazică) și ATP-ului în organism.

Capitolul VI tratează despre metabolismul, localizarea și rolul unor inhibitori ai sistemului nervos, ca: acidul γ-aminobutiric (GABA), 4-hidroxibutiratul (4-OHB) etc.

Partea a doua, care cuprinde 5 capitole, se ocupă de metabolismul mediatorilor în condiții patologice.

Capitolele I și II tratează despre metabolismul acetilcolinei, acidului glutamic, GABA și serotoninei în epilepsie și alte stări convulsive, iar capitolele III și IV despre alte maladii nervoase și mentale. De asemenea, sînt prezentate o serie de rezultate personale referitoare la activitatea colinesterazei, fosfatazei acide și lacticodehidrogenazei, obținute prin electroforeză în gel de amidon, titrare potențiometrică și metode histochimice.

În capitolul V, concluzii și rezumat, se trec în revistă faptele cele mai importante și rezultatele esențiale privind metabolismul normal și patologic al mediatorilor.

Prin aprecierea critică a bogatei literaturi științifice prezentate, ca și prin rezultatele personale obținute de autoare în decursul a 20 de ani de cercetare, cartea este valoroasă și utilă specialiștilor.

Natalia Moldoveanu
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Diagnosis and Treatment of Fetal Disorders (Diagnosticul și tratamentul afecțiunilor fătului), sub redacția KARLIS ADAMSONS, Lucrările Simpozionului internațional asupra diagnosticului și tratamentului afecțiunilor fătului, Dorado, Porto Rico, 1967; Springer Verlag, Berlin, 1968, 304 p.

Simpozionul ale cărui lucrări formează obiectul recenziei de față a avut ca temă urmărirea stării și evoluției fătului și dirijarea dezvoltării lui. Marea noutate a lucrărilor simpo-

zionului a fost prezentarea unor metode care permit investigarea directă a pacientului intrauterin. Au fost expuse cele mai noi metode de cercetare directă a placentei prin biopsie, de analiză a lichidului obținut prin amniocenteză, a sîngelui colectat din scalpul fătului și de prelucrare a unor date biochimice proprii mamei, care reflectă modificări ale stării fătului. Deși în privința posibilităților de diagnostic al afecțiunilor fătului medicina a înregistrat progrese apreciabile, acestea sînt mai puțin spectaculoase în domeniul tratamentului fătului. Totuși, lucrările simpozionului au evidențiat marile avantaje pe care o diagnosticare precisă le aduce terapiei pacientului intrauterin, chiar dacă aceasta se realizează indirect.

Acest simpozion, prin caracterul său inedit, suscită încă un viu interes în lumea medicală.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Data for Biochemical Research (Date pentru cercetarea biochimică), sub redacția R. M. C. DAWSON ș.a., ed. a II-a, Clarendon Press, Oxford, 1969, 654 p.

Cartea de față a fost editată pentru prima oară în 1959, pentru a oferi cercetătorilor biochimiști un material informativ practic asupra compușilor, reactivilor și tehnicilor cel mai frecvent folosite. Intenția autorilor nu a fost de a alcătui o lucrare exhaustivă de referințe, ci de a prezenta un material legat direct de practica de laborator. Ediția a II-a a fost îmbogățită cu secțiuni noi, corespunzătoare noilor preocupări din biochimie, iar vechiul material a fost revizuit și adus la zi. Fiecare secțiune a fost alcătuită de cîte un specialist cu o recunoscută practică de laborator, care a selectat informațiile considerate ca cele mai utile.

Cartea este împărțită în 27 de secțiuni, dintre care primele 15 cuprind referințe privitoare la toate clasele importante de compuși naturali. Următoarele secțiuni au un profil analitic, prezentînd informații asupra unor date fizico-chimice, termodinamice și electrochimice, precum și metode și tehnici de lucru în biochimie.

Cartea posedă un indice de subiecte, numeroase tabele, nomograme, grafice, ilustrații. Ea este de un real folos în practica cercetării biochimice, fapt atestat de însăși necesitatea publicării unei noi ediții.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Heidelberger Taschenbücher (Cărțile de buzunar din Heidelberg), nr. 54, 57/58 și 59/60, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1969.

În ultimii ani, editura Springer a inițiat o nouă serie de publicații, adresată cercetătorilor din domeniul științelor naturii. Lucrările din această serie, de dimensiuni relativ mici, au în primul rînd scopul de a introduce pe specialiștii dintr-o anumită ramură științifică în

problematica altor ramuri, adiacente, sau de a-i familiariza cu metode și tehnici de lucru mai speciale. Scrise cu competență, într-un stil foarte concis și la obiect, aceste cărți au un ridicat nivel științific, dar în același timp sînt ușor accesibile. Din cele 60 de lucrări apărute pînă în prezent în această serie, numerele 54, 57/58 și 59/60 se adresează biologilor, medicilor și biochimiștilor.

Günther Fuchs, *Mathematik für Mediziner und Biologen* (Matematica pentru medici și biologi), Heidelberger Taschenbücher nr. 54, 212 p. În această lucrare, autorul face un rezumat al noțiunilor de algebră, geometrie, geometrie analitică și analiză necesare pregătirii matematice a unui biolog. În continuare sînt prezentate cazuri de aplicare a matematicii în fiziologie, în statistica medicală și în prelucrarea datelor medicale, insistîndu-se asupra specificului aplicării metodei matematice în fiecare din domeniile amintite.

H. Dertinger, H. Jung, *Molekulare Strahlen Biologie* (Radiobiologia moleculară) Heidelberger Taschenbücher nr. 57/58, 255 p. Lucrarea cuprinde, în 14 capitole, un bogat material informativ referitor la problema menționată în titlu. În primul capitol sînt prezentate principalele aspecte ce vor fi tratate *in extenso* în capitolele următoare. Prima parte a cărții se ocupă de tratarea fizico-chimică a fenomenului radiației. A doua parte prezintă cîteva probleme speciale ale radiobiologiei, ca efectul iradierii asupra enzimelor, asupra proprietăților fizico-chimice și funcțiilor biologice ale acizilor nucleici, asupra virusurilor și bacteriilor. Ultimul capitol este consacrat problemei radiosensibilității, corelată cu complexitatea biologică.

C. Streffer, *Strahlen Biochemie* (Radiobiochimie), Heidelberger Taschenbücher nr. 59/60, 195 p. Cartea se recomandă ca o lucrare deosebit de utilă prin aspectele biochimice interesante pe care autorul le relevă în legătură cu fenomenul radiației materialelor biologice. Se accentuează modificările de structură și, mai ales, de metabolism ale diferitelor substanțe biologic active. Este comentat efectul iradierii asupra permeabilității și transportului activ al substanțelor, asupra sintezei substanțelor toxice, asupra lanțului respirator. În ultima parte, autorul rezumă acțiunile radiațiilor asupra diferitelor organisme.

Cele trei volume recenzate sînt sistematic alcătuite, prevăzute cu bogate liste bibliografice și indexuri de subiecte. Ele se dovedesc de un real folos mai ales tinerilor cercetători și studenților în medicină și biologie.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Tehnici de laborator în biochimie și biologia moleculară), vol. 1, sub redacția T. S. WORK și E. WORK, North-Holland Publishing Company, Amsterdam—Londra, 1969, 572 p.

Noua serie de manuale de laborator al cărei prim volum formează obiectul recenziei de față își propune să ofere biochimiștilor și cercetătorilor din domenii înrudite un material amănunțit și ușor accesibil asupra celor mai noi și folosite metode de cercetare în biochimie și biologia moleculară. O inovație adusă în domeniul publicațiilor științifice de redactorii seriei de față este aceea că fiecare parte a volumului este publicată și separat, în ediție de buzunar, pentru a fi la îndemîna cercetătorului interesat.

Volumul 1 al seriei conține trei părți : electroforeza în gel, gel-cromatografia și tehnici imunochimice de analiză. Cele trei părți sînt publicate și în ediții separate, de buzunar, sub următoarele titluri :

— A. H. Gordon, *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*, 1969, 150 p.

— L. Fischer, *An introduction to gel chromatography*, 1969, 246 p.

— J. Clausen, *Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules*, 1969, 176 p.

Prima parte a volumului tratează gel-cromatografia sub aspect teoretic și practic (tipuri comerciale de geluri, instalațiile de gel-cromatografie, tehnica de lucru, aplicațiile metodei, gel-cromatografia în strat subțire). A doua parte relevă aplicabilitatea electroforezei de zonă în amidon și poliacrilamidă. Se descriu aparatele și tehnicile de lucru, atît pentru scopuri analitice, cît și preparative. Partea a treia a volumului prezintă posibilitățile de folosire a microtehnicilor imunologice în analizele biochimice. Se pune accentul pe aplicarea practică a analizei imunochimice în tehnicile curente de laborator, evidențiindu-se erorile posibile de care tehnica este susceptibilă.

Fiecare din cele trei părți ale volumului este însoțită de un apendix deosebit de util pentru scopuri practice imediate, o bine documentată listă bibliografică și un indice de subiecte. Principiul de alcătuire a materialului, modul lui de prezentare și însăși structura volumului fac din acesta un instrument de mare ajutor pentru biochimiști.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Nucleic Acids in Immunology (Acizii nucleici în imunologie), Proceedings of a Symposium Held at the Institute of Microbiology of Rutgers, the State University, sub redacția O. J. PLESCIA și W. BRAUN, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1968, 724 p.

Volumul de față conține lucrările simpozionului de acizi nucleici în imunologie care a avut loc între 16 și 18 octombrie 1967, la Rutgers.

Lucrările s-a axat în special pe două aspecte : 1) acțiunea acizilor nucleici ca antigene și 2) rolul acizilor nucleici ca stimuli nespecifici ai răspunsului imun. Pe lîngă aceste teme, s-au mai dezbătut : rolul acizilor nucleici în formarea anticorpilor și rolul purtătorului în producerea de anticorpi antihaptene.

Problematica abordată fiind foarte bogată, spicuim din ea următoarele : metodele de obținere a anticorpilor față de oligo- și polinucleotide și folosirea lor la studierea structurii moleculare a acizilor nucleici, recunoașterea bolilor autoimune și identificarea ADN-ului în timpul mitozei și meiozei, efectele biologice ale anticorpilor antiribozomali, recunoașterea efectelor radiologice cu ajutorul metodelor imunologice, stimularea răspunsului imun normal și a celui inhibat prin iradiere, rolul complecșilor antigen-ARN în formarea anticorpilor, etapele biosintezei imunoglobulinelor, controlul genetic al sintezei acestora.

Tematica lucrărilor, care vizează domeniul comun al geneticii moleculare și al imunologiei, precum și discuțiile ce au urmat expunerii lor fac din acest volum o lucrare interesantă și utilă.

Doina Onică
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

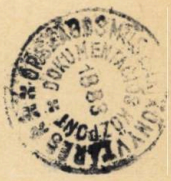
Chemico-biological interactions (Interacțiuni chimico-biologice), sub redacția G. P. WARWICK, E. FARBER și B. KETTERER, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, vol. 1, nr. 1, 1969, 124 p.

Această publicație cuprinde articole referitoare la modificările produse în sistemele biologice sub acțiunea substanțelor chimice de origine exogenă — produse sintetice sau substanțe care apar în mod natural. Redactorii își propun ca articolele cuprinse în prezenta publicație să aducă contribuții la lămurirea mecanismelor moleculare prin care aceste substanțe, străine organismului, modifică structura și funcțiile lui biologice. Dintre substanțele chimice exogene a căror acțiune va fi cercetată în viitoarele numere ale acestei publicații fac parte: toxine, agenți chimioterapeutici, anumite substanțe farmaceutice, pesticide, erbicide, fungicide, poluanți ai aerului, substanțe cancerigene. Sistemele biologice ce vor fi studiate cuprind: virusuri, organisme unicelulare, plante, mamifere. În paginile acestei publicații vor apărea însă și lucrări de biologie descriptivă și de microscopie electronică.

Primul ei număr cuprinde, în 124 de pagini, 9 lucrări cu o ilustrație grafică bogată și cu referiri bibliografice substanțiale.

Acoperind un domeniu restrîns de studiu, cel al interacțiunilor dintre substanțele chimice și sistemele biologice, noua revistă interesează pe toți cei care au preocupări în această direcție.

Doina Popov
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România



„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1970 JUN 17

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali,** 1966, 25 × 17,50, 375 p. + 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie,** 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies,** 1965, 25 × × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof.** RALUCA RIPAN, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue ,,Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF. 25 — DM. 20— Toute commande à l'étranger sera adresée à Centrala cărţii — Oficiul de comerţ exterior, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourres vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 13, NR. 2, P. 109—214, BUCUREŞTI. IUNIE, 1970

I. P. „Informaţia" — c. 5184

43816

Lei 20.—

E 1330

04

studii și cercetări de

biochimie

3

TOMUL 13

1970

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 3, p. 215—326, București, septembrie, 1970

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil :

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct :

H. SLUȘANSCHI

Membri :

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; M. MEZINCESCU ; I. VASILESCU ; TR. RĂDULESCU ; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție :

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 de lei.

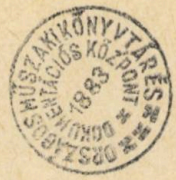
În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea de comerț exterior — LIBRI, Calea Victoriei nr. 126, Căsuța poștală 134 — 135, București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie"

ADRESA REDACȚIEI
București, Str. Docenților nr. 20
Sectorul I

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 13, nr. 3 1970

SUMAR

E. MACOVSCHI, M. RABEGA, Influenţa inhibitorilor metabolici asupra compoziţiei lichidului intracelular al frunzelor de porumb 219

L. M. BURUIANĂ, M. LERCH, A. DEMA, Polimorfismul L-asparaginazei de origini diferite 225

V. ALEXANDRESCU, Izoenzimele catalazei din porumb în primele etape de creştere 233

M. CÂRSTEANU, Influenţa vitaminei B_{12} asupra exosmozei electroliţilor din piele în vitiligo şi psoriazis 243

I. F. DUMITRU, D. IORDĂCHESCU, S. NICULESCU, G. ŞERBAN, Contribuţii la studiul L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei vegetale 249

C. DRAGOMIRESCU, Cercetări imunoelectroforetice asupra unor fragmente eliberate din regiunea Fc prin hidroliza imunoglobulinei G de iepure cu papaină şi pepsină 257

V. ELEFTERESCU, Eliberarea treptată a apei şi a altor componente din materia biostructurată a frunzelor de porumb, sub acţiunea azidei de sodiu . . 261

V. GHEŢIE, L. BUZILĂ, S. MIHĂESCU, Păstrarea fragmentelor de antigen în situsurile de combinare ale subunităţilor de anticorp rezultate din hidroliza şi reducerea complexelor imune 265

I. HURGHIŞIU, Influenţa virusurilor mozaicului conopidei şi mozaicului castraveţilor asupra activităţii ribonucleazei în anumite plante-test 275

A. MIHĂESCU, Eliberarea proteinelor din biostructura unor frunze şi fructe prin încălzire la temperaturi diferite 281

F. MIHĂILESCU, Studiul electroforetic al amilazelor secarei, orzului şi ovăzului în primele etape de creştere 285

F. MOSORA, Teoria biostructurii şi problema apei şi ionilor de clor în axonii giganţi de *Sepia* 291

C. MUŞOLAN, Cîteva consideraţii asupra aplicării metodei Ogur-Rosen la dozarea acizilor nucleici din sucurile vacuolar şi plasmatic ale frunzelor de porumb . . 301

G. NEAMŢU, C. BODEA, Pigmenţii carotinoidici din plante recoltate din regiuni montane şi subalpine 307

E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN, I. MOISA, Activitatea şi izoenzimele lactatdehidrogenazei din lichidul alantoidian al ouălor embrionate, inoculate cu virusul gripal A (PR.8) 313

RECENZII 319

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 3, p. 215 — 326, Bucureşti, septembrie, 1970

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tome 13, nr. 3 1970

CONTENTS

E. MACOVSCHI, M. RABEGA, The effect of metabolic inhibitors upon the composition of corn leaves intracellular fluid 219
L. M. BURUIANĂ, M. LERCH, A. DEMA, The polymorphism of L-asparaginase from different sources 225
V. ALEXANDRESCU, Maize catalase isoenzymes during the first growing stages 233
M. CARSTEANU, The influence of B_{12} vitamin on electrolyte exosmosis from the skin in vitiligo and psoriasis 243
I. F. DUMITRU, D. IORDĂCHESCU, S. NICULESCU, G. ŞERBAN, Contribution to the study of plant L-alanine : 2-oxoglutarate-aminitransferase . . 249
C. DRAGOMIRESCU, Immunoelectrophoretic studies of some fragments released from the Fc region of rabbit IgG following papain and pepsin digestion . . 257
V. ELEFTERESCU, Stepwise release of some components from the biostructure of maize leaves under the influence of sodium azide 261
V. GHEŢIE, L. BUZILĂ, S. MIHĂESCU, Maintenance of antigen fragments in the combining sites of antibody subunits resulting from digestion and reduction of immune complexes 265
I. HURGHIŞIU, The influence of cauliflower mosaic and cucumber mosaic viruses on the ribonuclease activity in certain test plants 275
A. MIHĂESCU, The release of proteins from the biostructure of some leaves and fruits by heating at different temperatures. 281
F. MIHĂILESCU, Electrophoretic study of rye, barley and oat amylases during the first growing stages 285
F. MOSORA, Biostructure theory and the problem of the water and chloride ions in the giant axons of the squid 291
C. MUŞOLAN, Some considerations regarding the use of "Ogur-Rosen" method for the estimation of nucleic acids in the vacuolar and plasmatic saps of maize leaves 301
G. NEAMŢU, C. BODEA, Carotenoid pigments in plants originating from mountainous and subalpine regions 307
E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN, I. MOISA, Lactate dehydrogenase activity and isoenzymes in allantoidian fluid of eggs, inoculated with grippal virus A (PR.8) 313

BOOK REVIEW 319

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 3, p. 215 — 326, Bucureşti, septembrie, 1970

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 219 – 224 (1970)

INFLUENȚA INHIBITORILOR METABOLICI ASUPRA COMPOZIȚIEI LICHIDULUI INTRACELULAR AL FRUNZELOR DE PORUMB

E. MACOVSCHI și M. RABEGA

Rezumat. — Introducînd în țesuturile vii (frunze de porumb) soluții de inhibitori metabolici (2,4-dinitrofenol, azidă de sodiu), se constată creșterea concentrației lichidului intracelular, scăderea tensiunii sale de vapori și a vitezei de evaporare. În lumina teoriei biostructurii, explicația acestor constatări este că inhibitorii metabolici eliberează o parte din apa și din substanțele hidrosolubile integrate în biostructură.

Conform concepțiilor actuale, în celulele vii apa se găsește sub *două forme* principale : „apa legată", cuprinsă în coloizi, și „apa liberă", în care sînt dizolvate numeroase substanțe. Multe reacții între aceste substanțe furnizează „energia metabolică", necesară atît producerii reacțiilor chimice endoterme, cît și desfășurării normale a fenomenelor fiziologice. Prin urmare, introducerea în țesuturile vii a inhibitorilor metabolici, substanțe capabile să frîneze și chiar să blocheze anumite reacții biochimice, micșorînd astfel producerea de energie, este urmată de perturbări ale metabolismului celular.

Aspecte noi apar în problema mecanismului de acțiune al inhibitorilor metabolici, dacă ea este examinată de pe pozițiile concepției biostructurale [1]. Conform acestei concepții, o parte din materia care alcătuiește protoplasma vie, deci și o parte din apa celulară, este integrată într-o structură cu totul specială, rămasă necunoscută pînă acum, numită „biostructură". De aceea, în celulele vii apa se găsește sub *trei forme* principale : „apa asimilată" sau apa biostructurată, care nu are însușiri de solvent, „apa liberă", în care sînt dizolvate numeroase substanțe, și „apa legată", cuprinsă în coloizi. O parte din energia metabolică produsă de reacțiile chimice dintre substanțele dizolvate în apa liberă a protoplasmei (soluția intracelulară) este necesară menținerii integrității biostructurii [1]. Prin urmare, introducerea în țesuturile vii a inhibitorilor metabolici va fi urmată nu numai de perturbări ale metabolismului, dar și de o destrămare parțială a biostructurii, cu eliberarea unei părți din apa și din celelalte substanțe integrate în ea. În consecință, ar fi de așteptat ca țesuturile vii, tratate cu inhibitori metabolici în doze nemortale, să conțină mai multă apă liberă și o cantitate mai mare de substanțe dizolvate în ea decît

țesuturile martor. Un asemenea efect al inhibitorilor metabolici nu a fost cunoscut și nici nu poate fi prevăzut pe baza concepțiilor de pînă acum cu privire la alcătuirea materiei vii.

Pentru verificarea acestei ipoteze s-a luat în considerare faptul că presiunile hidrostatice mari nu omoară nici ființele vii și nici organele izolate în stare de supraviețuire; deci, ele nu destramă biostructura. Înseamnă că prin stoarcerea țesuturilor vii se scurge din ele, sub formă de suc, numai apa lor liberă, împreună cu substanțele dizolvate în ea, apa biostructurată și apa legată rămînînd în țesut. Or, dacă inhibitorii metabolici cauzează destrămarea parțială a biostructurii, ar trebui ca țesuturile tratate cu acești inhibitori să dea prin stoarcere o cantitate mai mare de suc cu o cantitate sporită de substanțe hidrosolubile.

Cercetările efectuate pe frunze de porumb tratate cu 2,4-dinitrofenol (DNP) și cu azidă de sodiu au confirmat pe deplin această previziune, deoarece s-a constatat că în prezența inhibitorilor menționați se obține aproximativ de două ori mai mult suc, cu un conținut de două pînă la patru ori mai mare de substanțe dizolvate în el [2].

Deși rezultatele astfel obținute sînt concludente, totuși era important de verificat dacă și *in situ*, adică în frunze întregi și nevătămate, tratate cu inhibitori metabolici, lichidul intracelular devine mai concentrat în substanțe hidrosolubile. O astfel de verificare s-ar putea face pe baza următorului raționament: dacă în prezența inhibitorilor metabolici substanțele hidrosolubile sînt eliberate din biostructură în proporție mai mare decît apa, înseamnă că în țesuturile tratate cu acești inhibitori crește nu numai cantitatea apei libere, dar și concentrația substanțelor dizolvate în ea. Creșterea concentrației soluțiilor fiind însoțită de o micșorare corespunzătoare a tensiunii lor de vapori, scade totodată și viteza de evaporare. Prin urmare, ar fi de așteptat ca viteza de evaporare a apei din frunzele vii tratate cu inhibitori metabolici să fie mai mică decît cea din frunzele martor. Nici efectul acesta al inhibitorilor metabolici nu poate fi prevăzut pe baza concepției de pînă acum despre alcătuirea protoplasmei vii.

În consecință, pentru a vedea dacă previziunile de mai sus, formulate în lumina concepției biostructurale, se verifică, am urmărit viteza de evaporare a apei din frunzele vii în care s-au introdus soluții de inhibitori metabolici în comparație cu frunze martor, în care s-au introdus fie apă, fie soluții de substanțe care nu provoacă destrămarea biostructurii, iar pe de altă parte am controlat dacă concentrația sucurilor stoarse din frunzele tratate cu inhibitori metabolici este mai mare decît cea a sucurilor stoarse din frunzele martor.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

Am lucrat pe frunzele plantulelor de porumb HS 301 și HS 409, după 14—17 zile de la însămînțare și creștere în condiții de seră. Ca inhibitori metabolici am folosit 2,4-dinitrofenol și azidă de sodiu, în soluții apoase de concentrație 10^{-3} M, respectiv 10^{-2} M, iar ca substanțe care nu destramă biostructura am folosit zaharoza și DL, α-alanina, în concentrație de 10^{-2} M.

Introducerea acestor substanţe, precum şi a apei a fost realizată prin metoda vacuum-infiltraţiei, preconizată de Kursanov (vezi [3]), în probe de cîte 1,50 g frunze. Apoi frunzele se uscau prin tamponare cu hîrtie de filtru, se înşirau pe un fir de aţă şi se cîntăreau din 30 în 30 de minute; între cîntăriri, firul se întindea între două suporturi, iar apa din frunze se evapora liber, în aer, la temperatura laboratorului (+21,7°C).

Pentru obţinerea sucului am folosit probe de cîte 50 g frunze infiltrate cu aceleaşi soluţii şi în aceleaşi condiţii. Imediat după infiltrare şi uscare prin tamponare cu hîrtie de filtru, frunzele se cîntăreau şi apoi se storceau la o presă hidraulică de laborator, tip Hafico, model 2 litri, prevăzută cu un dispozitiv special pentru cantităţi mici de material. Presiunea se ridica treptat la 150 atm şi se menţinea pînă la încetarea scurgerii sucului. După măsurarea volumului, sucurile se centrifugau timp de 30 de minute la 4 000 rot/min şi apoi se măsura indicele lor de refracţie cu refractometrul Abbe, model Carl Zeiss Jena. Concentraţiile globale ale sucurilor au fost calculate pe baza tabelelor întocmite de Wagner [4] şi exprimate convenţional în grame % clorură de potasiu. Tensiunile de vapori au fost calculate cu ajutorul tabelelor Landolt-Börnstein [5].

Într-o altă serie de experienţe am procedat la fel, cu singura deosebire că, înainte de stoarcere, frunzele se etalau pe masa de laborator, pînă ajungeau la greutatea iniţială de 50 g.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Din cîntăririle succesive ale frunzelor infiltrate cu apă şi cu soluţii de 2,4-dinitrofenol, azidă de sodiu, zaharoză şi DL, α-alanină (tabela 1), s-a constatat că numai frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici care provoacă destrămarea parţială a biostructurii pierd din greutate mai puţin decît celelalte. Înseamnă că viteza de evaporare a apei din frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici este considerabil mai mică decît la frunzele martor. Tot din tabela 1 se observă că, în cazul frunzelor infiltrate cu soluţii

Tabela 1

Urmărirea evaporării apei din frunzele de porumb după vacuum-infiltrare cu 2,4-dinitrofenol, azidă de sodiu, apă, zaharoză şi DL, α-alanină

Timpul după infiltrare ore	Frunze infiltrate cu :				
	DNP	NaN_3	apă	zaharoză	DL, α-alanină
0	1,93	1,90	1,75	1,78	1,78
0,5	1,87	1,86	1,56	1,57	1,59
1,0	1,79	1,72	1,40	1,42	1,44
1,5	1,71	1,63	1,25	1,26	1,27
2,0	1,65	1,56	1,10	1,12	1,15
2,5	1,60	1,50	1,00	1,05	1,07
3,0	1,54	1,44	0,89	0,92	0,93
3,5	1,49	1,38	0,79	0,80	0,82
4,0	1,42	1,32	0,72	0,75	0,78
4,5	1,37	1,28	0,65	0,67	0,68

de zaharoză şi DL, α-alanină, care nu destramă biostructura, scăderea greutăţii frunzelor în urma evaporării apei este practic aceeaşi cu a frunzelor martor, infiltrate numai cu apă.

Volumul şi concentraţia sucurilor obţinute din frunzele infiltrate fie cu soluţii de inhibitori metabolici, fie cu apă şi stoarse fie imediat după infiltrare, fie după aducerea frunzelor la greutatea iniţială sînt prezentate în tabelele 2 şi 3. Se constată, în concordanţă cu rezultatele anterioare [2] obţinute pe frunze care au absorbit atît apa, cît şi soluţiile de inhibitori

Tabela 2

Volumul, indicele de refracţie (n_D) şi concentraţia globală (exprimată convenţional în g % KCl) ale sucurilor obţinute din frunze proaspete de porumb, stoarse la 150 atm imediat după vacuum-infiltrarea lor timp de 1 oră la + 21,7°C cu apă (frunze martor) şi cu soluţii de 2,4-dinitrofenol de concentraţie 10^{-3} M şi azidă de sodiu 10^{-2} M

V ml			n_D			g % KCl		
H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3
12	23	28	1,3342	1,3355	1,3360	0,74	1,72	2,10
11	25	30	1,3344	1,3356	1,3365	0,89	1,78	2,48
13	26	32	1,3343	1,3356	1,3369	0,83	1,78	2,77
12	20	34	1,3340	1,3358	1,3370	0,60	1,92	2,85

Tabela 3

Volumul, indicele de refracţie (n_D) şi concentraţia globală (exprimată convenţional în g % KCl) ale sucurilor obţinute din frunze proaspete de porumb, vacuum-infiltrate timp de 1 oră la +21,7°C cu apă (frunze martor) sau cu soluţii de 2,4-dinitrofenol de concentraţie 10^{-3} M şi azidă de sodiu 10^{-2} M, stoarse la 150 atm abia după ce au revenit la greutatea lor iniţială (50 g), prin evaporare la temperatura camerei

V ml			n_D			g % KCl		
H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3
10	20	26	1,3343	1,3354	1,3361	0,83	1,63	2,16
9	19	28	1,3343	1,3356	1,3365	0,83	1,78	2,48
11	19	30	1,3342	1,3355	1,3370	0,74	1,72	2,85
10	22	31	1,3340	1,3360	1,3371	0,60	2,10	2,91

metabolici, că volumul sucurilor obţinute din frunzele infiltrate cu soluţii de inhibitori depăşeşte volumul sucului obţinut din frunzele infiltrate cu apă. Faptul acesta indică punerea în libertate a unei părţi din apa biostructurată, prin destrămarea parţială a biostructurii ţesutului foliar sub influenţa inhibitorilor metabolici infiltraţi. Tot din tabelele 2 şi 3 se constată că indicii de refracţie şi deci concentraţiile sucurilor obţinute din frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici le depăşesc pe acelea ale sucurilor obţinute din frunzele martor. Cum volumul sucurilor obţinute din frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici îl depăşeşte pe acela al frunzelor martor infiltrate cu apă, înseamnă că primele sucuri conţin substanţe hidrosolubile în cantitate mult mai mare decît sucurile martor. Aceasta se datoreşte diferitelor substanţe hidrosolubile eliberate din biostructură.

Cum evaporarea apei din frunze duce la creşterea progresivă a concentraţiei soluţiei intracelulare, viteza de evaporare scade cu timpul. De aceea, pentru compararea vitezei de evaporare a apei din frunzele vii tratate cu soluţii de inhibitori metabolici, respectiv cu apă şi cu soluţii de substanţe care nu influenţează direct biostructura, trebuie să luăm în considerare datele care se obţin la începutul experienţei, cînd evaporarea primelor cantităţi de apă nu este urmată de modificări prea importante ale concentraţiei soluţiei intracelulare. Or, în decursul primei jumătăţi de oră frunzele tratate cu inhibitori metabolici au pierdut în medie 0,05 g apă, pe cînd frunzele martor tratate cu apă şi cu soluţii de zaharoză şi DL, α-alanină au pierdut în medie 0,20 g apă (calculul s-a efectuat pe baza mediilor datelor cuprinse în primele două rînduri ale tabelei 1). Înseamnă că viteza de evaporare a apei din frunzele tratate cu inhibitori metabolici în condiţiile cercetărilor noastre scade cu 75% faţă de aceea din frunzele martor. Această scădere a vitezei de evaporare se datoreşte scăderii tensiunii de vapori a soluţiei intracelulare, provocată de creşterea concentraţiei în substanţe hidrosolubile provenite din biostructură. Într-adevăr, cu ajutorul indicilor de refracţie am stabilit că concentraţia globală, exprimată convenţional în g% clorură de potasiu, a fost de 0,83 g% la sucul stors din frunzele martor, şi de 1,78 şi, respectiv, 2,33 g % la cele stoarse din frunzele tratate cu 2,4-dinitrofenol şi azidă de sodiu. La +21,7°C acestor trei sucuri le corespund următoarele tensiuni de vapori: 19,409 mm, 19,336 mm şi, respectiv, 19,293 mm, scăderile faţă de tensiunea de vapori a apei la aceeaşi temperatură (19,473 mm) fiind de 0,064 mm, 0,137 mm şi, respectiv, 0,180 mm. Aceste diferenţe sînt suficiente pentru a explica deosebirile dintre viteza de evaporare a apei din frunzele tratate cu inhibitori metabolici şi din frunzele martor.

Astfel, rezultatele experimentale obţinute ne-au permis să constatăm că viteza de evaporare a apei din frunzele tratate cu inhibitori metabolici este mai mică decît cea din frunzele martor, tratate numai cu apă sau cu soluţiile unor substanţe care nu provoacă destrămarea parţială a biostructurii.

Faptul acesta dovedeşte că şi *in situ*, adică în frunze întregi şi nevătămate, tratate cu inhibitori metabolici, lichidul intracelular devine mai concentrat în substanţe hidrosolubile decît în frunzele martor.

Prezentat la redacţie la 11 aprilie 1970

Universitatea Bucureşti, Facultatea de biologie, Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
2. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
3. A. N. Belozerski, N. I. Proskuriakov, *Prakticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii*, Gosudarstvennoe izdatelstvo „Sovetskaia Nauka", Moskva, 1951, p. 293.
4. B. Wagner, *Tabellen zum Eintauchrefraktometer Sonderhausen*, 1907, p. VIII şi 12.
5. Landolt-Börnstein, *Physikalisch-Chemische Tabellen*, Springer Verlag, Berlin, 1912, p. 360, tab. 106 a; p. 411, tab. 119 a.

THE EFFECT OF METABOLIC INHIBITORS UPON THE COMPOSITION OF CORN LEAVES INTRACELLULAR FLUID

SUMMARY

By introducing into living tissues (corn leaves) metabolic inhibitor solutions (2,4-dinitrophenol, sodium azide) an increase in intracellular fluid concentration and a decrease in its vapour tension and speed of evaporation were noted.

According to the biostructure theory a possible explanation of these facts is that metabolic inhibitors release a part of the water and water-soluble substances normally integrated in the biostructure.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 225 – 231 (1970)

POLIMORFISMUL L-ASPARAGINAZEI DE ORIGINI DIFERITE

L. M. BURUIANĂ, MARTA LERCH şi ANCA DEMA

Rezumat. — S-au determinat activitatea şi polimorfismul L-asparaginazei din ficatul şi serul de cobai, vacă, porc, găină şi din unele celule (drojdie de bere şi suşe de *Erwinia carotovora*). Enzimogramele respective erau obţinute prin gel-filtrare pe Sephadex.

Rezultatele obţinute dovedesc existenţa a cel puţin două izoenzime principale. Activitatea şi poziţia izoenzimelor variază cu sursa şi cu gradul de reticulare al Sephadexului întrebuinţat.

Particularităţile diferitelor enzimograme sînt scoase în evidenţă, ceea ce va permite o purificare mai uşoară a enzimei şi obţinerea unor tipuri cu însuşiri specifice.

Se semnalează faptul că L-asparaginaza este activată de către ionii de magneziu şi calciu şi că activitatea ei scade prin dializă.

L-asparaginaza (L-asparagin-amidohidrolaza, E. C. 3.5.1.1) este o enzimă a cărei importanţă a crescut de cînd Broome [1] a arătat că acţiunea antileucemică a serului de cobai se datoreşte acestei enzime. Faptul a făcut ca numeroşi cercetători să se preocupe de găsirea unor surse bogate în asparaginază, de separarea, purificarea, particularităţile şi modul său de acţiune.

Deşi asparaginaza este destul de răspîndită în plante, microorga, nisme şi animale, nu toate tipurile sînt active faţă de agentul leucogen-ceea ce a făcut să sporească numărul de cercetări cu privire la polimorfismul ei şi comportarea faţă de anumiţi efectori.

Sînt interesante de citat în acest sens cercetările recente ale lui Campbell şi colab. [4], care au arătat că în cazul asparaginazei din *Esch. coli* B se pot separa prin cromatografie pe DEAE-celuloză două fracţiuni, EC1 şi EC2, prima lipsită de activitate antileucemică. Cele două fracţiuni se deosebesc din punct de vedere biochimic prin aceea că, pe cînd EC1 este inactivă la pH 5, EC2 prezintă aproape aceeaşi activitate atît la pH 5, cît şi la pH 8,4.

Importanţa polimorfismului L-asparaginazei reiese şi din constatarea că, în calitatea sa de proteină, enzima poate da naştere în cursul administrării sale la reacţii de imunitate, ceea ce impune a se utiliza preparate cu proprietăţi antigenice diferite.

Mecanismul de acţiune al L-asparaginazei nu este încă bine lămurit. Se presupune că enzima descompune asparagina, indispensabilă sintezei proteinelor tumorale.

Cercetările lui Broome [2] au pus în evidență însă faptul că administrarea L-asparaginazei mărește de 12 ori conținutul în acid aspartic al sîngelui, iar limfoamele sensibile la L-asparaginază sînt lipsite de asparagin-sintetază, constatări care complică explicarea acțiunii antitumorale a asparaginazei.

Aspectele de mai sus și altele în legătură cu însușirile acestei enzime ne preocupă și pe noi. În prezenta lucrare redăm cîteva rezultate relativ la polimorfismul L-asparaginazei din diferite surse și la acțiunea unor factori asupra activității sale.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-au utilizat ca sursă de enzimă ficatul de cobai, găină, vacă, porc și serurile respective, precum și drojdia de bere și culturi de *Erwinia carotovora*[1], microorganism care, după Wade și colab. [7], este o sursă foarte bogată în L-asparaginază.

În cazul ficatului, acesta era triturat în proporție de 1 : 3 (g/v) cu soluție tampon borat 0,2 M, pH 8,5. Se centrifuga timp de 20 de minute cu viteza de 10 000 rot/min, iar supernatantul se utiliza ca sursă de enzimă. În cazul germenilor și al levurilor, acestea se sonicau în soluție tampon borat, după separarea lor prin centrifugare.

Determinarea activității enzimatice a soluțiilor se făcea cu ajutorul metodei lui Brown și colab. [3], modificată după cum urmează : la 0,2 ml soluție enzimatică se adaugă 1 ml soluție tampon borat 0,2 M, pH 8,5, 1 ml soluție de L-asparagină 0,04 M și 0,8 ml soluție de NaCl 0,15 M. Conținutul eprubetei se împărțea în două părți egale, 1,5 ml fiind transferați în altă eprubetă. Peste proba martor se adăugau 4 ml acid tricloracetic 20%, iar cealaltă se incuba 60 de minute la 37°C. După acest timp se adăugau la fel 4 ml acid tricloracetic. Se filtrau ambele probe, iar în filtrat se doza amoniacul. În acest scop, la 0,5 ml filtrat se adăugau 10 ml soluție de fenol proaspăt distilat, care conținea nitroprusiat de sodiu 0,01%, 0,5 ml NaOH 25% și 1 ml soluție de NaOCl 0,01 M, proaspăt preparată. Culoarea albastră se colorimetra după 20 de minute la 644—700 nm, în raport cu un martor preparat numai cu reactivii întrebuințați. Se scădea cantitatea de amoniac găsită în martor din aceea a probei incubate. Se raporta la 1 mg proteină, conținutul determinîndu-se cu tehnica lui Miller [6].

Separarea izoenzimelor se făcea prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 sau G-200, care dădeau rezultate diferite după sursa enzimatică utilizată, așa cum se va vedea mai jos. Coloanele utilizate aveau în toate cazurile dimensiunile 2 × 20 cm și erau echilibrate cu soluția tampon borat. Eluția se făcea cu aceeași soluție, prinzîndu-se fracțiuni de cîte 5 ml, pînă la totala desorbție a proteinei.

În continuare s-au mai cercetat unele particularități ale L-asparaginazei din diferite surse, care vor fi menționate în capitolul ce urmează.

[1] Culturile de *Erwinia carotovora* au fost preparate de către dr. I. Suhaci, șef de secție la Institutul Pasteur din București, căruia îi mulțumim cu această ocazie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea enzimatică a extractelor din diferite surse este arătată în tabela 1.

Tabela 1

Activitatea L-asparaginazei din unele organe şi celule

Specia	Organul	Activitatea medie gamma NH_3 / mg proteină
Cobai	ficat	91,0
	ser	245,3
Găină	ficat	88,8
	ser	0
Vacă	ficat	10,9
	ser	22,8
Porc	ficat	11,4
	ser	3,3
Erwinia carotovora	în germeni	102—254
Drojdie de bere	în celule	32,0

Se vede că serul de cobai şi germenii de *E. carotovora* prezintă cea mai mare activitate enzimatică. Menţionăm că activitatea L-asparaginazică a germenilor de *E. carotovora* scade rapid cu pasajul. Deşi ficatul de găină prezintă o activitate asemănătoare cu a celui de cobai, serul de găină nu conţine L-asparaginază. Invers, la vacă, activitatea asparaginazică a serului este mai mare decît a ficatului. Deşi activitatea serului de vacă este de circa 10 ori mai mică decît la cobai, avînd în vedere că de la această specie se poate obţine o cantitate mult mai mare de ser, constatarea ar putea fi valorificată în practică.

În figurile care urmează sînt redate enzimogramele obţinute în cazul diferitelor extracte.

Din aceste enzimograme reiese că în toate cazurile L-asparaginaza este o enzimă polimorfă, constituită din două fracţiuni principale, care se pot separa uşor prin gel-filtrare pe Sephadex.

În cazul cobaiului (fig. 1) există o mare deosebire între poziţia, deci greutatea moleculară, a izoenzimelor din ficat şi a acelora din ser.

Deşi asemănătoare, enzimogramele ficatului de cobai prezintă deosebiri caracteristice faţă de acelea ale ficatului de găină (se va compara fig. 1 cu fig. 2).

Activitatea izoenzimelor separate pe Sephadex G-100 este mai mare decît dacă se utilizează Sephadex G-200. În cazul L-asparaginazei din *Erwinia carotovora* lucrurile se petrec invers, şi anume activitatea izoenzimelor separate pe Sephadex G-200 este mai mare decît a celor separate pe Sephadex G-100 (fig. 3). Faptul este foarte net vizibil în figura 4, unde se reprezintă activitatea izoenzimelor din diferite surse în urma separării pe Sephadex G-200. Deosebirea ar putea fi explicată prin existenţa unor

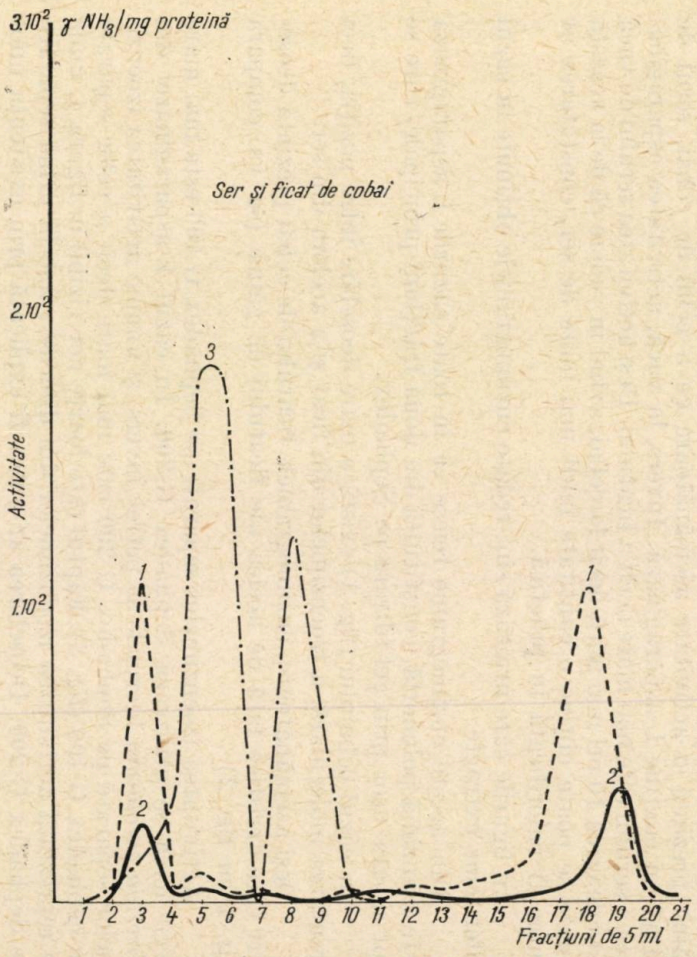


Fig. 1. —Enzimograma L-asparaginazei din ficatul și serul de cobai.
1 — Gel-filtrarea extractului de ficat pe Sephadex G-100; *2* — gel-filtrarea extractului de ficat pe Sephadex G-200; *3* — gel-filtrarea serului de cobai pe Sephadex G-100.

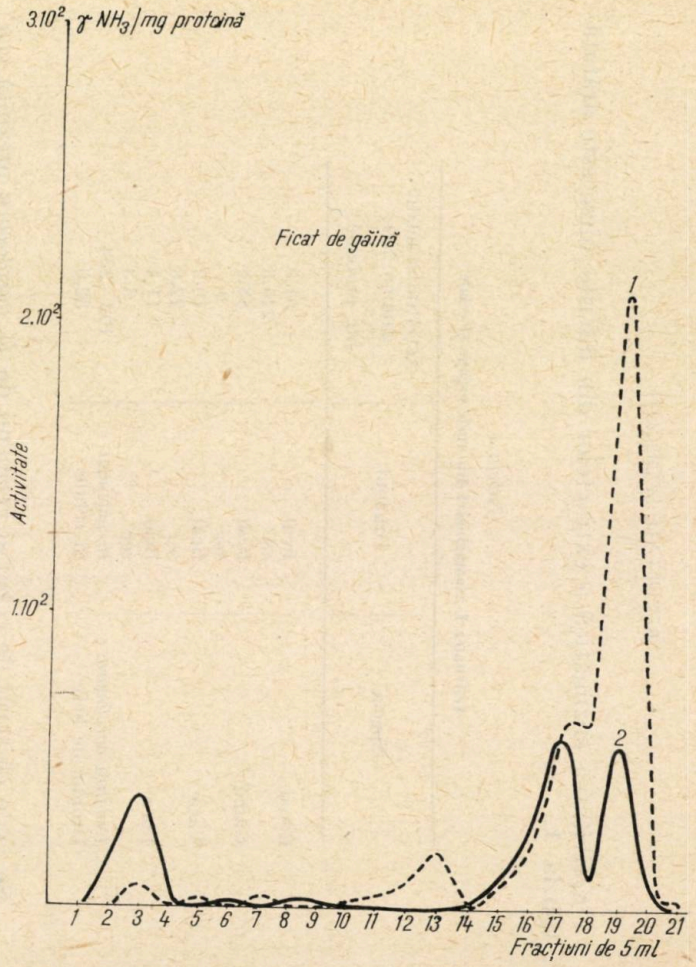


Fig. 2. — Enzimograma L-asparaginazei din ficatul de găină.
1 — Gel-filtrarea pe Sephadex G-100; *2* — gel-filtrarea pe Sephadex G-200.

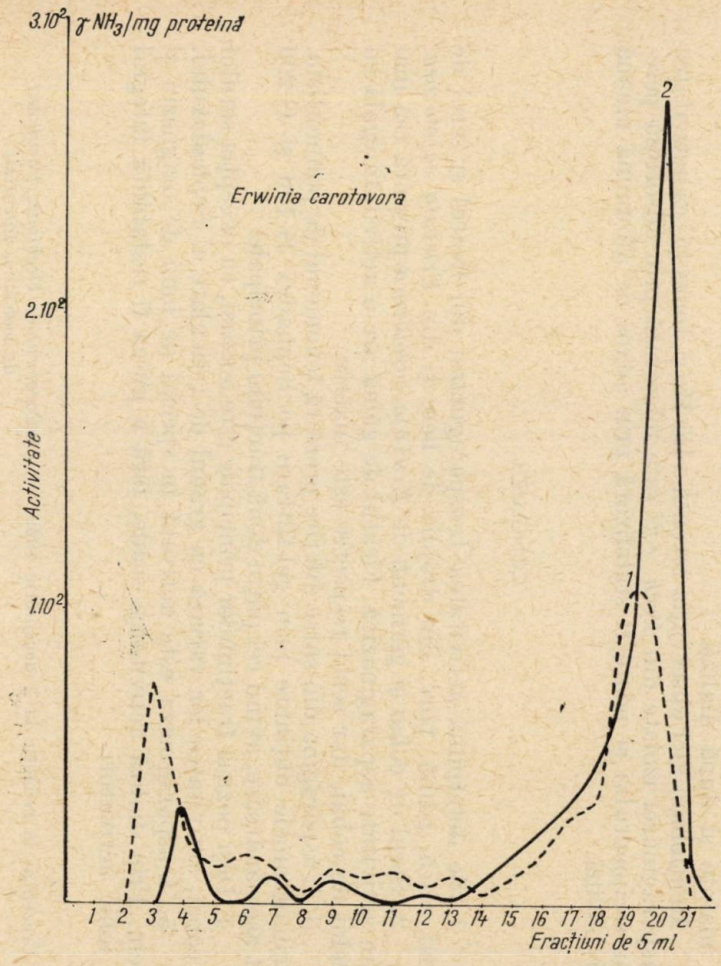


Fig. 3. — Enzimograma L-asparaginazei din germenii de *Erwinia carotovora*.

1 — Gel-filtrarea pe Sephadex G-100; 2 — gel-filtrarea pe Sephadex G-200.

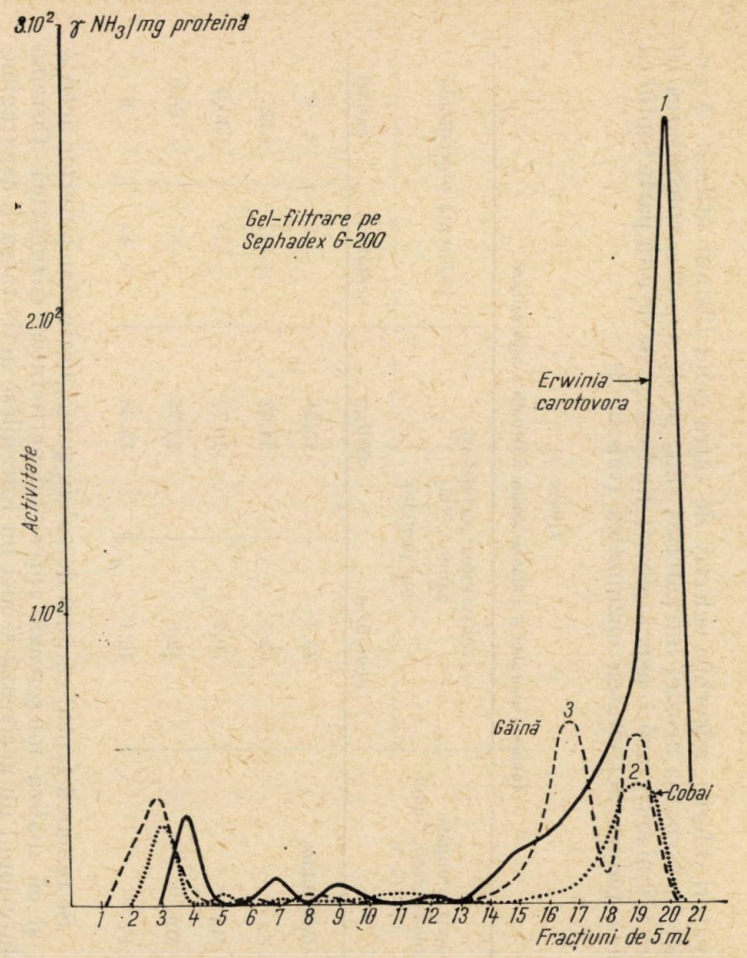


Fig. 4. — Comparație între activitatea izoenzimelor L-asparaginazei de diferite origini, separate prin gel-filtrare pe Sephadex G-200.

1 — Enzimograma extractului de germeni de *Erwinia Carotovora*; 2 — enzimograma extractului de ficat de cobai; 3 — enzimograma extractului de ficat de găină.

activatori diferiţi, adsorbiţi selectiv de către gelul filtrant utilizat. Argumente în favoarea acestei interpretări sînt, pe de o parte, constatarea că anumiţi ioni activează L-asparaginaza din ficat şi, pe de altă parte faptul că dializa reduce activitatea enzimatică (tabela 2).

Tabela 2

Influenţa unor ioni şi a dializei asupra activităţii L-asparaginazei

Ioni adăugaţi în concentraţie finală 0,0012 M	Activitatea enzimatică gamma NH_3 / mg proteină		Diferenţa procentuală	
	nedializat	dializat	nedializat	dializat
fără adaos	25,4	15,25	0	0
Ca^{++}	62,7	34,62	+147	+127
Mg^{++}	70,2	20,77	+175	+33,5
Mn^{++}	42,6	27,75	+ 67	+ 80,0
Fe^{++}	46,4	15,25	+ 82	0

Se remarcă faptul că ionii de calciu şi magneziu sînt puternic activatori şi că dializa micşorează apreciabil activitatea enzimatică. Cisteina şi glutationul nu activează şi nici nu restabilesc activitatea L-asparaginazei înainte şi după dializă.

Menţionăm aici observaţia recentă a lui Ho şi Jones [5] că activitatea L-asparaginazei izolate din *Esch. coli* este micşorată prin adsorbţia pereţilor recipientului şi poate fi stabilizată prin adaos de albumină umană sau bovină.

CONCLUZII

1. Se determină activitatea L-asparaginazei din ficatul şi serul de cobai, vacă, găină, porc, din drojdia de bere şi din *Erwinia carotovora*.

2. Serul de cobai şi germenii de *Erwinia carotovora* prezintă cea mai mare activitate asparaginazică. Ficatul de găină are o activitate egală cu a celui de cobai, dar serul respectiv este inactiv.

3. L-asparagina din surse diferite prezintă fenomenul de polimorfism. Enzimogramele obţinute prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 şi G-200 sînt asemănătoare, avînd cel puţin două fracţiuni principale.

4. Deşi poziţia fracţiunilor principale este aceeaşi, cu excepţia serului de cobai, activitatea lor variază cu gradul de reticulare al Sephadexului.

5. L-asparaginaza este activată în special de ionii de magneziu şi calciu. Prin dializă activitatea scade, fără a putea fi restabilită integral de ionii activatori.

Prezentat la redacţie la 2 decembrie 1969

Laboratorul de biochimie, Facultatea de zootehnie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. D. Broome, Nature, **191**, 1114 (1961).
2. J. D. Broome, Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, **30**, 690 (1968).
3. R. H. Brown, G. D. Duda, S. Korkes, P. Handler, Arch. Biochem. Biophys., **66**, 301 (1957).
4. H. A. Campbell, L. T. Mashburn, E. A. Boyse, L. J. Old, Biochemistry, **6**, 721 (1967).
5. P. P. K. Ho, I. L. Jones, Biochim. biophys. Acta, **177**, 172 (1969).
6. G. L. Miller, Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
7. H. E. Wade, R. Elsworth, D. Herbert, J. Keppic, K. Sargeant, Lancet, 776 (1968).

THE POLIMORPHISM OF L-ASPARAGINASE FROM DIFFERENT SOURCES

SUMMARY

L-asparaginase activity and polymorphism from liver and serum of guinea pig, cow, swine, hen and some cells (yeast and Erwinia carotovora strains) were determined. Enzymograms were obtained by gel filtration on Sephadex. Results proved the existence of at least two main isoenzymes. The activity and the position of isoenzymes are different, depending on the source and the reticulation degree of the Sephadex types employed.

The peculiarities of different enzymograms are emphasized thus permitting an easier purification of the enzyme.

Some other features are reported, namely activation of the enzyme by magnesium and calcium ions and the influence of dialysis upon its activity.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 233–241 (1970)

IZOENZIMELE CATALAZEI DIN PORUMB ÎN PRIMELE ETAPE DE CREŞTERE

VICTORIA ALEXANDRESCU

Rezumat. — În porumbul dublu hibrid 336, pe măsură ce germinarea avansează, faţă de nivelul zilei a 2-a de germinare catalaza este din ce în ce mai puţin activă, pentru a fi destul de slabă în frunze. Formaţiunile seminţei negerminate conţin o singură formă moleculară slab electronegativă; după germinare, în plantulă şi scutel mai apare o nouă formă, mai electronegativă, iar în frunză găsim doar forma moleculară mai electronegativă. Coeficientul de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate de către catalaza din extracte brute este foarte variabil pentru acelaşi organ sau ţesut. Schimbările coeficientului de temperatură nu sînt însoţite întotdeauna şi de apariţia sau dispariţia unor forme moleculare ale catalazei, electroforetic distincte. Îndepărtarea compuşilor cu greutate moleculară mică prin dializă duce la obţinerea unui coeficient de temperatură egal cu cel al izoenzimei eluate de pe electroforegramă; deci acest coeficient poate fi modificat de unii compuşi solubili cu greutate moleculară mică prezenţi în extract.

Cercetarea formelor moleculare ale catalazei la plante a preocupat pe unii cercetători [1], [2], locul principal ocupîndu-l cercetările pe porumb [3]—[8]. Prin electroforeza în gel de amidon [3] s-a constatat că activitatea catalazică lipseşte complet la omogenatele de tulpină, rădăcină şi scoarţă, dar este prezentă sub forma unei benzi în endosperm în a 15-a zi după polenizare, în mătase, în polen şi în ştiuletele tînăr, imatur, şi sub forma a două benzi în frunză. Fracţiunile evidenţiate reprezintă, din punctul de vedere al mobilităţii electroferetice, patru forme moleculare.

Studierea izoenzimelor catalazei a indicat că enzima este analogă LDH, aparent existînd ca tetramer cu trei enzime hibride [4], [5]. Prin electroforeza în gel de agar s-au evidenţiat fracţiunile existente în extracte de frunze şi cloroplaste [6], în formaţiunile seminţei de porumb în repaus [7] şi după germinare, cînd coleoptilul avea 5 cm [8].

Aceste ultime cercetări nu ne oferă însă o imagine a evoluţiei formelor moleculare ale catalazei în primele etape de creştere. În plus, am vrut să stabilim dacă există o legătură între mobilitatea electroforetică a izoenzimelor catalazei şi coeficientul de temperatură al reacţiei catalizate de aceasta. Wieland şi colab. [9], stabilind coeficientul de temperatură al izoenzimelor LDH din rinichi, creier şi inimă de şobolan, au constatat o scădere continuă a coeficientului de temperatură, paralel cu creşterea vitezei de migrare a izoenzimei.

Lucrarea de faţă prezintă un tablou al catalazei din seminţele porumbului dublu hibrid 336, în primele 18 zile de la începerea germinării. S-a urmărit dinamica catalazei din punct de vedere cantitativ, prin determinarea activităţii, a evoluţiei formelor moleculare separabile pe cale electroforetică şi a coeficientului de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate de către catalaza din extractele brute şi din eluatele izoenzimelor după electroforeză. Pentru aceasta s-au examinat diversele ţesuturi ale seminţei, iar la plantule şi frunze şi sucul lor vacuolar.

MATERIALE ŞI METODE

S-a lucrat pe porumb dublu hibrid 336, procurat de la I.C.C.P.T.-Fundulea. Prelucrarea materialului s-a descris în lucrări anterioare [10]—[12].

Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,5% (Special Agar Noble NBC), pe plăci de sticlă de 15 × 3 cm, folosindu-se în cuvă tamponul acid boric-borax, pH 8,4; pentru plăci s-a utilizat acelaşi tampon, diluat cu două părţi apă distilată. Startul s-a făcut la mijlocul plăcii. S-a lucrat la 210 V, 0,7 mA/cm, timpul de migrare fiind de 5 ore. Evidenţierea benzilor cu activitate catalazică s-a făcut după metoda Uriel [13], prin imersarea plăcilor timp de cîteva minute în apă oxigenată 2‰. Eluţia izocatalazelor de pe benzile de agar s-a făcut în apă distilată, timp de 1 oră.

Determinarea activităţii catalazei din extracte şi sucuri vacuolare s-a efectuat la aparatul Warburg: în diverticul se punea 1 ml de extract sau de suc, ca atare sau diluat, iar în partea centrală a vasului 2 ml de apă oxigenată 2‰, în soluţie tampon de fosfaţi de sodiu, pH 6,8. Citirile se făceau după 15 min, la 15°C. Rezultatele sînt redate în µl O_2 eliberat, precum şi în gradul de diluţie practicat pentru eliberarea unui volum aproximativ constant de oxigen. Pentru determinarea coeficientului de temperatură s-a lucrat şi la 25°C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea catalazei. Activitatea catalazică a extractelor obţinute din axul embrionar, din scutelul şi din endospermul seminţei de porumb în repaus este redată în tabela 1.

Tabela 1

Activitatea catalazei din formaţiunile seminţei de porumb în repaus

Formaţiunea seminţei	Raport de extracţie ml/g	Diluţie %	µl O_2 eliberaţi în 15 min la 15°C	Activitatea catalazei raportată la 1 mg material	
				µl O_2 în 15 min la 15°C	Valori relative
Ax embrionar	10/1	1,5	110	73 000	16,3
Scutel	5/1	1	121	60 500	13,5
Endosperm	2/1	5	112	4 480	1

Din această tabelă reiese că activitatea catalazică este considerabil mai mare în scutel şi în axul embrionar decît în endosperm.

În perioada germinării, activitatea catalazică a plantulei (coleoptilul plus rădăcinile) prezintă o valoare maximă după 2 zile de germinare, apoi scade, rămînînd practic constantă între a 4-a şi a 6-a zi, pentru ca după 9 zile să găsim o activitate mult mai mică (tabela 2).

Tabela 2

Activitatea catalazei în timpul germinării porumbului

Formaţiunea seminţei	Zile de germinare	Raport de extracţie ml/g	Diluţie %	µl O_2 eliberaţi în 15 min la 15°C
Plantulă	2	1/1	0,25	71
	4		1	73
	6		1	75
	9		15	75
Scutel	2	5/1	0,40	120
	4		0,20	138
	6		0,20	132
	9		0,50	120
Endosperm	2	1,5/1	20	112
	4		20	86
	6		40	68
	9		50	80

La o altă serie de seminţe puse la germinat, în ziua a 6-a am comparat activitatea catalazei din coleoptil, rădăcini, plantula întreagă şi sucul vacuolar al plantulei. Din tabela 3 se constată că coleoptilul prezintă o activitate catalazică mai mare decît rădăcinile. Sucul vacuolar evidenţiază o activitate catalazică mai mică decît extractul, arătînd localizarea preferenţială a catalazei în restul celulei.

Tabela 3

Activitatea catalazei din plantulă după 6 zile de germinare (raportul de extracţie 1 ml extractant/1 g material; diluţia extractului 5%)

	Plantula întreagă	Coleoptilul	Rădăcinile	Sucul vacuolar
µl O_2 eliberaţi în 15 min la 15° C	188	221	71	82

În timpul germinării, scutelul prezintă activitatea catalazică cea mai mare, ceea ce arată că este sediul unei activităţi metabolice deosebit de intense. Activitatea creşte de aproximativ 5 ori în primele 4 zile de germinare, o regăsim de aceeaşi intensitate şi după 6 zile, pentru ca apoi să scadă. Axul embrionar prezintă însă maximul activităţii catalazice la începutul perioadei de germinare (2 zile). Diferenţe în intensitatea metabolismului acestor două părţi ale embrionului s-au mai constatat şi în cazul fosfatazei acide [12].

Activitatea catalazică slabă a endospermului scade în toată perioada germinării seminţei, demonstrînd atenuarea continuă a proceselor respiratorii bazate pe această enzimă sau a metabolismului endospermului în totalitate.

Frunzele, în perioada de 11—18 zile de la semănare, manifestă o activitate catalazică slabă, care poate rămîne de acelaşi ordin de mărime sau poate chiar să crească. Sucul vacuolar al frunzelor manifestă o activitate catalazică mai mică decît aceea a extractelor respective (tabela 4).

Tabela 4

Activitatea catalazei din frunze normale şi etiolate (raportul de extracţie 0,4 ml extractant/1 g frunze; diluţia 5% atît la extract cît şi la sucul vacuolar)

Frunze	Zile de creştere	µl O_2 eliberaţi în 15 min la 15° C	Coeficientul de temperatură
Normale — extract	11	42	—
	13	71	—
	15	90	1,76
	18	95	—
Normale — suc vacuolar	11	32	—
	13	51	—
	15	76	0,87
	18	80	—
Etiolate — extract	11	74	1,09
Etiolate — suc vacuolar	11	131	1,27
Etiolate şi lăsate 3 zile la lumină—extract	14	160	1,64
Etiolate şi lăsate 3 zile la lumină—suc vacuolar	14	116	1,74

Extractele obţinute din frunze etiolate prezintă o activitate catalazică practic de acelaşi ordin de mărime ca şi cele normale. Sucul vacuolar se comportă însă diferit, fiind mult mai activ decît extractul. Dacă frunzele etiolate au fost ţinute în următoarele 3 zile în condiţii normale de lumină, se observă o considerabilă intensificare a activităţii catalazice a extractului lor, care ajunge să o depăşească pe aceea a sucului vacuolar, astfel că, în final, activitatea sucului vacuolar este mai mică decît a extractului, aspect specific frunzelor normale.

Datele obţinute ne duc la ideea că această enzimă se poate găsi cu preponderenţă în sucul vacuolar sau în restul celulei, în funcţie de necesităţile metabolismului, care sînt dirijate şi de condiţiile de mediu.

Este cunoscut faptul că seriile diferite de seminţe puse la germinat sau de plante în creştere se pot deosebi foarte mult între ele prin activitatea lor enzimatică, deşi condiţiile biologice sînt aproximativ aceleaşi.

Acest fenomen este foarte accentuat la catalaza din frunze, care poate prezenta o activitate foarte slabă, cînd se lucra cu extractul sau sucul vacuolar ca atare, sau enzima prezenta o activitate destul de mare pentru a se lucra în cazul frunzelor normale cu o diluţie de 5%, iar la sucul vacuolar al frunzelor etiolate cu o diluţie de 2%.

Al doilea fenomen observat este o labilitate accentuată a moleculelor de catalază din frunze, încît în decurs de 1 oră activitatea preparatului se reduce la jumătate, pe cînd la alte loturi activitatea rămîne practic aceeaşi timp de cîteva ore. Labilitatea moleculelor catalazei creşte în sensul sămînţă → sămînţă germinată → frunze, fapt care ne-a determinat să lucrăm cu extracte proaspete, şi nu cu preparate liofilizate, la care este necesară o prealabilă dializare de cîteva ore.

Separarea electroforetică a izocatalazelor şi stabilirea coeficientului de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate. Porumbul dublu hibrid 336, prezentat în această lucrare, reprezintă un organism care, după cum se va vedea mai jos, conţine pentru catalază puţine forme moleculare decelabile pe cale electroforetică. De aceea, am cercetat şi coeficientul de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate, la o diferenţă de 10°C, pentru a stabili dacă există o legătură directă între mobilitatea electroforetică a izocatalazelor şi acest coeficient.

Extractele proteice brute din axul embrionar, din scutelul şi din endospermul seminţei de porumb dublu hibrid 336 negerminate evidenţiază, în condiţiile noastre de lucru, o singură fracţiune cu activitate catalazică, situată pe enzimogramă la aproximativ 1 cm de la start, spre catod. Deci, în sămînţă există o singură formă moleculară de catalază, a cărei sarcină electrică globală este slab electronegativă, dacă ţinem seama de efectul curentului de electroendosmoză ce are loc în agar (fig. 1*a*).

Din tabela 5 se constată că valorile coeficientului de temperatură, obţinute cu extracte brute din aceste trei formaţiuni ale seminţei negerminate, sînt destul de apropiate, dar nu identice.

Tabela 5

Coeficientul de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate de către catalaza din extractele brute ale formaţiunilor seminţei de porumb negerminate şi după germinare

Materialul cercetat		Raport de extracţie ml/g	Diluţia %	µl O_2 eliberaţi în 15 min		Coeficientul de temperatură
				15°C	25°C	
Sămînţa negerminată	ax embrionar	1/1	1	80	122	1,52
	scutel	5/1	1	100	147	1,47
	endosperm	2/1	2,5	40	64	1,60
După 6 zile de germinare	coleoptil	1/1	1	87	137	1,57
	rădăcini	1/1	3	52	91	1,75
	plantulă-extract	1/1	1	56	93	1,66
	plantulă-suc vacuolar	—	1	51	82	1,60
	scutel	5/1	0,2	245	256	1,04
	endosperm	1,5/1	40	71	146	2,05

Germinarea duce, începînd chiar cu a 2-a zi, la evidenţierea în axul embrionar a două forme moleculare de catalază : una, situată de la start spre catod, există şi în sămînţa negerminată, iar a doua rămîne în regiunea startului. Coleoptilul, rădăcinile şi sucul vacuolar al plantulei, după 6 zile de germinare, evidenţiază aceleaşi două forme moleculare. Activitatea fracţiunii catalazice din regiunea startului este mult mai slabă decît cea a fracţiunii dinspre catod (fig. 1*b*). Scutelul seminţei în curs de germinare conţine şi el aceste două forme moleculare ale catalazei, pe cînd endospermul relevă doar forma moleculară existentă şi în sămînţa negerminată. Coeficientul de temperatură obţinut cu extractele din coleoptil, rădăcini, plantula întreagă şi cu sucul vacuolar al ei are valorile 1,57—1,75, în funcţie de sursa enzimei. În cazul scutelului însă, aceleaşi două fracţiuni catalazice prezintă coeficientul de temperatură 1,04, deci mult mai mic. La fracţiunea catalazică a endospermului, a cărei mobilitate electroforetică nu se modifică prin germinarea seminţei, coeficientul de temperatură este 2,05, aşadar crescut.

După cum se vede, aceste schimbări ale coeficientului de temperatură nu sînt însoţite întotdeauna şi de apariţia sau dispariţia unor forme moleculare ale catalazei electroforetic distincte.

Frunzele de porumb prezintă o slabă activitate catalazică (tabela 4); după electroforeză se evidenţiază o fracţiune în regiunea startului, atît în extractele proteice brute, cît şi în sucul vacuolar (fig. 1*c*). Frunzele etiolate (extract şi suc vacuolar) conţin aceeaşi fracţiune catalazică ca şi cele verzi. Valoarea coeficientului de temperatură pentru catalaza din extract este însă mai mare decît pentru cea din sucul vacuolar şi variază, după cum este determinată, la frunze normale sau etiolate.

Cercetarea sistematică a coeficientului de temperatură ne-a arătat că aceste valori nu sînt caracteristice organului sau formaţiunii din care a fost obţinut extractul sau sucul vacuolar, deoarece serii din aceleaşi seminţe pot duce la obţinerea de extracte la care coeficientul de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate se modifică foarte mult, ajungînd ca, de exemplu în cazul sucului vacuolar al frunzelor provenite de la plante crescute practic în aceleaşi condiţii, să fie apropiat de cel al extractului. Aceste constatări sînt în concordanţă cu cele exprimate de Kniaghinicev [14], care a arătat că coeficientul de temperatură şi energia de activare nu trebuie privite ca valori constante, absolute, deoarece variază în funcţie de dezvoltarea plantei, presupunînd că variaţiile acestui coeficient s-ar datora modificării proprietăţilor coloidale ale proteinei-enzimă. Spre deosebire de Kniaghinicev, sîntem de părere că nu avem de-a face cu modificarea proprietăţilor coloidale ale enzimei, ci cu modificarea mediului în care se găseşte enzima, mediu determinat de condiţiile de creştere a plantei. De aceea, acest coeficient ar putea caracteriza ţesutul la un moment dat.

O dovadă că coeficientul de temperatură obţinut pentru enzime nepurificate nu reprezintă o constantă a enzimei din acel ţesut o constituie şi modificarea lui în timpul păstrării extractului sau sucului vacuolar, cu toate că, electroforetic, se obţin aceleaşi forme moleculare ale enzimei. Constatăm că valoarea coeficientului de temperatură al reziduului este 0,80, deci asemănătoare aceluia al sucului vacuolar în momentul obţinerii lui, pe cînd supernatantele, atît de la extract, cît şi de la sucul vacuolar,

ajung pînă a 2-a zi la valori apropiate : 1,71 (extractul) și 1,62 (sucul vacuolar). Reiese că partea din catalază care prin păstrare se aglomerează, iar prin centrifugare se depune rămîne cu un coeficient de temperatură subunitar, pe cînd partea solubilă din supernatant prezintă un coeficient de temperatură mult mai mare. Precizăm că extractul și sucul vacuolar proaspăt preparat prezintă același coeficient de temperatură, chiar dacă au fost centrifugate la 600 sau 12 000 g.

Coeficienții de temperatură în jurul valorii 1 arată că, pentru producerea reacției, moleculele de catalază au nevoie de o energie de activare mică, iar cu cît valoarea se apropie de 2, moleculele respective au nevoie de o energie de activare mai mare [15]. Privite din acest punct de vedere, valorile obținute pentru coeficientul de temperatură ne-ar putea indica nivelul energetic al enzimei în țesutul respectiv. Astfel, endospermul seminței negerminate ar conține o formă moleculară de catalază a cărei energie de activare este mai mică decît după germinare. Tot așa, în cazul frunzelor, sucul vacuolar conține o formă moleculară a catalazei care are nevoie de o energie de activare mult mai mică decît energia necesară catalazei din extractul celular respectiv. Această deducție este valabilă în cazul cînd valorile obținute de noi nu sînt rezultatul distrugerii celulelor și deci al existenței împreună a unor compuși care în celulă se găsesc separați.

Rezultatele obținute pe extracte brute ne-au determinat să lucrăm pe fracțiunile catalazice după separarea lor electroforetică. În felul acesta eliminăm mulți compuși ai extractului brut. Pentru aceasta am ales frunza, extractul și sucul vacuolar, precum și endospermul înainte și după germinarea seminței, deoarece conțin cîte o singură fracțiune catalazică.

Astfel, coeficientul de temperatură al catalazei eluate din regiunea startului, obținută din extractul sau sucul vacuolar al frunzelor, are în ambele cazuri aproximativ valoarea 1,25. Această valoare este intermediară între cele obținute cu extractul și sucul vacuolar total. Se pare deci că sucul vacuolar conține un factor care scade energia de activare a reacției produse de catalază, pe cînd extractul conține un factor responsabil de creșterea energiei de activare a enzimei.

În cazul endospermului am putut lucra și cu liofilizat, la care am eliminat deci moleculele mici prin dializă. În acest caz constatăm că coeficientul de temperatură al enzimei din liofilizat are aceeași valoare ca în cazul fracțiunii eluate de pe electroforegramă : pentru endospermul seminței negerminate 1,32, iar pentru cel al seminței după 6 zile de germinare 2,50. La frunze nu am putut lucra și cu liofilizat sau cu extractul dializat, deoarece activitatea catalazică scădea foarte mult pînă a 2-a zi. De aici reiese că este necesar să eliminăm moleculele mici prin dializă, pentru a avea valori asemănătoare pentru o izoenzimă după separarea ei electroforetică și în liofilizatul sau extractul brut. În al doilea rînd, cele două catalaze din endospermul seminței negerminate și după germinare, cu toate că au aceeași mobilitate electroforetică, nu au același coeficient în condițiile

noastre de lucru. Aceasta s-ar putea datora fie faptului că forma moleculară a catalazei din endospermul seminţei negerminate este diferită, ca structură, de cea obţinută din endospermul seminţei după germinare, diferenţa constînd în aminoacizii amfoteri, care nu duc la modificarea mobilităţii electroforetice, fie faptului că anumiţi compuşi rămaşi după dializă îi schimbă proprietăţile energetice, fără a-i schimba mobilitatea electroforetică. Rămîne ca o problemă deschisă purificarea izoenzimelor şi stabilirea coeficientului de temperatură al acestora.

CONCLUZII

1. În porumbul dublu hibrid 336, pe măsură ce germinarea avansează, catalaza este din ce în ce mai puţin activă, pentru a fi destul de slabă în frunze.

2. În primele 18 zile de creştere s-au evidenţiat două forme moleculare ale catalazei, separabile pe cale electroforetică.

3. Coeficientul de temperatură al vitezei de descompunere a apei oxigenate de către catalaza din extracte brute nu este caracteristic unui organ sau ţesut.

4. Coeficientul de temperatură obţinut cu extracte brute nu caracterizează enzima sub aspectul formelor moleculare prezente.

5. Îndepărtarea compuşilor cu greutate moleculară mică prin dializă, duce la obţinerea unui coeficient de temperatură egal cu cel al izoenzimei eluate de pe electroforegramă; deci acest coeficient poate fi modificat de unii compuşi solubili cu greutate moleculară mică prezenţi în extract.

Prezentat la redacţie la 6 martie 1970

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. K. Rudolph, M. A. Stahmann, Nature, **204**, 474 (1964).
2. R. Hall, Austr. J. Biol. Sci., **20**, 419 (1967).
3. J. G. Scandalios, J. Hered., **55**, 281 (1964).
4. L. Beckman, J. G. Scandalios, J. L. Brewbaker, Science, **146**, 1174 (1964).
5. J. G. Scandalios, Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A., Wash., **53**, 1035 (1965).
6. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **5**, 97 (1968).
7. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, Rev. roum. Biochim., **5**, 189 (1968).
8. I. Brad, N. Hurduc, St. Niculescu, Z. Marcu, St. cerc. biochim., **11**, 117 (1968).
9. Th. Wieland, G. Pfleiderer, F. Ortanderl, Biochem., **331**, 103 (1959).
10. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, St. cerc. biochim., **12**, 315 (1969).
11. I. Hagima-Călin, St. cerc. biochim., **13**, 47 (1970).
12. D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, 377 (1969).
13. J. Uriel, Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 277 (1958).
14. M. I. Kniaghinicev, *Biochimia pşeniţii*, Selihozghiz, Moscova—Leningrad, 1951.
15. N. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes*, Longmans, Londra, 1958, p. 155.

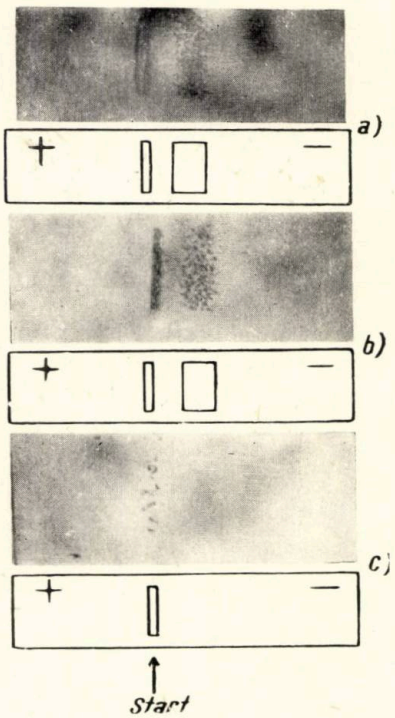


Fig. 1. — Enzimograma obținută în gel de agar în soluție tampon acid boric-borax, pH 8, 2, pentru izocatalazele din porumb.

a — Ax embrionar, scutel, endosperm; *b* — plantulă, scutel, endosperm după 2, 4, 6 și 9 zile de germinare a seminței; *c* — frunze; extract sau suc vacuolar.

MAIZE CATALASE ISOENZYMES DURING THE FIRST GROWING STAGES

SUMMARY

In 336 double hybrid maize, as germination progresses, catalase activity is lower and lower, with respect to the level of the 2-nd day of germination, being rather weak in leaves. Non-germinated seed formations contain a single weak electronegative molecular form; after germination a new, more electronegative, form appears both in seedling and scutellum, while in leaves one found only the more electronegative molecular form. The temperature coefficient of hydrogen peroxide decomposition ratio by the catalase from rough extracts largely varies in the same organ or tissue. The changes in the temperature coefficient are not always accompanied by the appearance or disappearance of some catalase molecular forms, electrophoretically distinct. Removing of low molecular compounds by dialysis, leads to the obtaining of a temperature coefficient equal to that of the isoenzyme eluated from electrophoregramm; accordingly, this coefficient could be modified by some soluble low molecular compounds present in extracts.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 243–248 (1970)

INFLUENȚA VITAMINEI B_{12} ASUPRA EXOSMOZEI ELECTROLIȚILOR DIN PIELE ÎN VITILIGO ȘI PSORIAZIS

MIOARA CÂRSTEANU

Rezumat. — Tratamentul cu vitamină B_{12} în vitiligo și psoriazis atrage după sine o modificare a exosmozei de electroliți, de la valorile corespunzătoare acestor stări patologice spre valori similare celor obținute pe pielea sănătoasă a bolnavilor cercetați. Suprimarea din tratament a acestei vitamine provoacă modificări în exosmoza de electroliți în sensul revenirii acesteia la valorile corespunzătoare stării patologice respective, în vreme ce suprimarea pe parcurs a unuia sau altuia din medicamentele cu acțiune relativ specifică în terapia acestor maladii nu modifică exosmoza electroliților din piele. Este probabil că vitamina B_{12} își manifestă acțiunea asupra unor sisteme fizico-chimice la nivelul organului cutanat.

Diferitele săruri aflate în spațiile intra- și extracelulare ale pielii joacă un rol important în realizarea echilibrului ionic, iar apariția afecțiunilor cutanate este deseori însoțită de variații în conținutul ionic al pielii [1].

Deoarece în lucrări anterioare [2]—[4] am stabilit variația exosmozei electroliților în diferite boli de piele, precum și legătura dintre acest fenomen și acțiunea substanțelor corticoterapice administrate cazurilor în speță, am considerat necesar să urmărim cum se reflectă în procesul de exosmoză a electroliților din piele influența metabolică a vitaminei B_{12}, administrată unor bolnavi atinși de vitiligo și psoriazis.

Sînt cunoscute modificările cutanate provocate de carențele în acid folic și vitamină B_{12}, datorită atît tulburărilor ce survin în procesele de metabolism proteic la care aceşti biocatalizatori participă în mod normal, cît și stărilor de anemie macrocitară induse în astfel de ocazii [5]. Pentru aceste motive, cu ajutorul metodei exosmozei electroliților [6] s-a urmărit, prin determinări conductometrice, exosmoza electroliților din piele în cazuri de vitiligo și psoriazis.

MATERIAL ȘI METODE

Metoda folosită a fost cea descrisă în lucrări anterioare [6], permițînd cercetarea unor aspecte ale biochimismului pielii în condiții de structură intactă a materialului biologic viu. Ea prevede utilizarea unui cristalizor Jena, cu diametrul de 4,5 cm și capacitatea de 15 ml, care se umple pînă la marginea de sus cu apă bidistilată, la temperatura camerei, și se aplică

pe suprafaţa pielii. Odată realizat contactul dintre tegument şi apa bidistilată din cristalizor, începe exosmoza electroliţilor din piele, care durează 15 min. Apoi cristalizorul se îndepărtează şi se măsoară conductibilitatea electrică a soluţiei, cu ajutorul unei celule conductometrice de tip Arrhenius, cu doi electrozi de platină în formă de disc, cu diametrul de 1 cm şi grosimea de 1 mm, aşezaţi orizontal la distanţă de aproximativ 3 mm. Constanta vasului 0,0475. Calculul conductibilităţii specifice a fost făcut după formula $\lambda = \frac{K}{Rn} - \lambda_0$, în care :

K — constanta vasului ; R — rezistenţa din circuit, în ohmi ; n — valoarea citită pe scală ; λ_0 — conductibilitatea electrică specifică a apei bidistilate.

Determinările au fost făcute, la temperatura de 21—22°C, la 6 bolnavi de vitiligo şi 11 bolnavi de psoriazis, atît pe placarde, cît şi pe pielea aparent sănătoasă a regiunilor simetrice.

În cursul tratamentelor specifice aplicate bolnavilor cercetaţi, se introducea şi se suprima consecutiv din tratament vitamina B_{12}, urmărindu-se în tot acest timp exosmoza electroliţilor în condiţiile arătate mai sus.

Doza zilnică administrată fiecărui bolnav a fost de 1 000 γ /ml vitamină B_{12}.

Reprezentarea rezultatelor obţinute de noi nu constituie o medie, ci cazuri individuale, care evoluează similar la toţi bolnavii trataţi.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din cercetările făcute constatăm, în primul rînd, că exosmoza electroliţilor din pielea aparent sănătoasă a bolnavilor cercetaţi, măsurată prin determinări conductometrice, prezintă valori apropiate de limitele normale. În acelaşi timp însă, măsurătorile de exosmoză făcute înainte de tratament pe placardele de vitiligo conduc totdeauna la valori sub limitele normale, iar cele efectuate pe placarde de psoriazis arată în toate cazurile valori conductometrice mult crescute faţă de cele obţinute pe pielea sănătoasă (tabelele 1 şi 2).

În al doilea rînd se constată că introducerea în tratament a vitaminei B_{12} atrage după sine o exosmoză de electroliţi similară celei obţinute pe pielea sănătoasă a bolnavilor în speţă ; cu alte cuvinte, introducerea vitaminoterapiei cu B_{12} în cazurile de vitiligo determină o creştere a exosmozei electroliţilor din placarde pînă la valori normale, iar în cazurile de psoriazis ea provoacă o scădere a exosmozei electroliţilor pînă la valori normale.

Subliniem faptul că suprimarea din tratament a acestei vitamine provoacă fluctuaţii în procesul de exosmoză a electroliţilor din placardele bolnavilor, în sensul obţinerii unor valori specifice cazului patologic respectiv (vitiligo sau psoriazis). Valorile reintră însă în limitele normale o dată cu reintroducerea în tratament a vitaminei B_{12}. Mai mult, aşa cum se poate vedea şi din tabela 2, se constată că aceste modificări ale exosmozei electroliţilor din placardele bolnavilor studiaţi se produc foarte rapid, adică la un timp foarte scurt după instalarea sau reinstalarea tratamentului cu vitamină B_{12}.

Tabela 1

Acțiunea vitaminei B_{12} asupra exosmozei din piele în vitiligo

Data	Inițiale	Sex	Conductibilitate electroliți pe pielea aparent sănătoasă	Conductibilitate electroliți pe placarde de vitiligo	Tratament	Observații
6.IV.1959	*L.E.*	F	$126 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$109 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	complex B, vitamină C_{500} fenergan, raze ultraviolete	placardă în apropiere de axila st., piele normală martor în apropiere de axila dr.
12.IV.1959	*L,E.*	F	$128 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$36 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
18.IV.1959	*L.E.*	F	$139 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$39 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
24.IV.1959	*L.E.*	F	$115 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$76 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	se suprimă complexul B	complex B suprimat din 21.IV.1959
26.IV.1959	*L.E.*	F	$134 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$66 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
29.IV.1959	*L.E.*	F	$129 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$117 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	s-a introdus vitamina B_{12}	vitamină B_{12} din 27.IV.1959
4. V.1959	*L.E.*	F	$119 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$121 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	ușoară tendință de pigmetare
8. V.1959	*L.E.*	F	$134 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$128 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
13. V.1959	*L.E.*	F	$123 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$139 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—

Tabela 2

Acțiunea vitaminei B_{12} asupra exosmozei electroliților din piele în psoriazis

Data	Inițiale	Sex	Conductibilitate electroliți pe pielea aparent sănătoasă	Conductibilitate electroliți pe placarde de psoriazis	Tratament	Observații
8.IV.1959	*C.N.*	B	$182 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$302 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	vitamină B_2, B_6, endotoxină, fenergan	Placarde antebraț dr.; piele normală martor, antebraț st.; determinări după 6 zile de tratament
10.IV.1959	*C.N.*	B	$167 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$181 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	se introduce vitamină A și B_{12}	din 9.IV.1959
13.IV.1959	*C.N.*	B	$186 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$133 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
15.IV.1959	*C.N.*	B	$172 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$257 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	se întrerupe vitamina B_{12}	din 14.IV.1959
17.IV.1959	*C.N.*	B	$185 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$168 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	se întrerupe vitamina A; se reintroduce vitamina B_{12}	din 16.IV.1959
20.IV.1959	*C.N.*	B	$179 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$145 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
22.IV.1959	*C.N.*	B	$143 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$153 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	—
24.IV.1959	*C·N.*	B	$149 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	$151 \cdot 10^{-7} \cdot \Omega^{-1}$	același tratament	placardele resorbite

În sfîrșit, suprimarea pe parcurs a unuia sau altuia din medicamentele cu acțiune mai mult sau mai puțin specifică în terapia acestor maladii nu modifică exosmoza electroliților din piele.

Ținînd seama de faptul că vitiligo se caracterizează prin incapacitatea melanocitelor din zonele atinse de a forma pigment melanic și că precursorul melaninei în procesul de melanogeneză este tirozina, s-ar părea că acțiunea acestei vitamine s-ar manifesta, indirect, asupra metabolismului tirozinei prin intermediul acidului folic, care participă la decarboxilarea acestui aminoacid [7]—[12].

Această ipoteză, precum și constatările făcute de noi în prezenta lucrare cu privire la acțiunea vitaminei B_{12} în vitiligo sînt în neconcordanță cu faptul cunoscut că vitamina B_{12} este implicată în menținerea grupării tiolice sub formă redusă (—SH), iar aceste grupări inhibă formarea melaninei.

Pe de altă parte, vitamina B_{12} reprezintă un factor de creștere [13]—[16], intervenind în metabolismul azotat al multor aminoacizi. De aceea, dacă se iau în considerare teoriile care preconizează în psoriazis o proliferare celulară exagerată la nivelul placardelor [17], [18], prezența ei în tratamentul psoriazisului ar trebui să determine o accentuare a patofenomenelor respective.

Aceste considerații ne fac să conchidem că, mai degrabă, vitamina B_{12} își manifestă acțiunea la nivelul pielii prin intermediul altor sisteme biochimice, cum ar fi echilibrul hidroelectrolitic intra- și extracelular sau permeabilitatea pielii și a membranelor celulare. Aceste considerații sînt susținute și de observația amintită că, încă de la instalarea tratamentului cu vitamină B_{12}, atît în vitiligo, cît și în psoriazis, exosmoza electroliților din pielea lezată tinde spre valori normale, fapt care traduce modificări rapide de ordin biochimic și fizico-chimic, realizate mult înainte de restabilirea unei integrități tisulare morfo-histologice.

CONCLUZII

Vitaminoterapia cu B_{12} la bolnavi de vitiligo și psoriazis [1] readuce în limite normale exosmoza de electroliți din placarde. Această acțiune se manifestă rapid și se produce, probabil, direct asupra unor sisteme biochimice din organul cutanat.

Prezentat la redacție la 2 martie 1970

Institutul de biochimie, București

[1] Cazurile patologice ne-au fost puse la dispoziție de Clinica a II-a dermatologică din București, de sub conducerea acad. prof. S. Longhin.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Reinberg, J. Bourgeois-Spinase, M. Hincky, E. Sidi, J. invest. Derm., **31**, 231 (1958).
2. Mioara Cârsteanu, St. cerc. biochim., **9**, 263 (1966).
3. R. Dumitriu, Mioara Cârsteanu, Fiziol. norm. patol., **1**, 57 (1967).
4. Mioara Cârsteanu, St. cerc. biochim., **10**, 99 (1967).
5. Şt. G. Nicolau, Al. Bădănoiu, *Elemente de dermatologie fiziopatologică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1967, p. 351.
6. E. Macovschi, S. Comoroşan, Ärztliche Forsch., **12**, 5 (1958).
7. J. M. Noronha, M. Silverman, J. biol. Chem., **237**, 3299 (1962).
8. T. Kato, S. Shimizu, J. Vitaminol., **9**, 94 (1963).
9. S. Fukui, Y. Tamao, T. Kato, T. Takahashi, S. Shimizu, J. Vitaminol., **10**, 202 (1964).
10. A. W. Johnson, N. Sharo, F. Wagner, Biochim. biophys. Acta, **72**, 107 (1963).
11. L. Smith, L. E. Mervyn, Biochem. J., **86**, 102 (1963).
12. H. A. Lee, R. H. Abeles, J. biol. Chem., **238**, 2337 (1963).
13. W. S. Beck, S. Hook, B. H. Barnett, Biochim, biophys. Acta, **55**, 455 (1962).
14. W. S. Beck, M. Goulian, S. Hook, Biochim. biophys. Acta, **55**, 470 (1962).
15. Y. Tamao, T. Kato, S. Shimizu, S. Fukui, J. Vitaminol., **10**, 211 (1964).
16. H. Weisbach, B. G. Redfield, H. Dickerman, J. biol. Chem., **239**, 1942 (1964).
17. W. Montagna, W. Lobitz, *The Epidermis*, Acad. Press., New York — Londra, 1964, p. 540.
18. S. Rothman, *Physiology and Biochemistry of the Skin*, Univ. of Chicago Press., Chicago, Illinois, 1954.

THE INFLUENCE OF B_{12} VITAMIN ON ELECTROLYTE EXOSMOSIS FROM THE SKIN IN VITILIGO AND PSORIASIS

SUMMARY

The treatment with B_{12} vitamin in vitiligo and psoriasis determines a modification in electrolyte exosmosis from pathological values to similar values with those obtained on normal human skin. The suppression of this vitamin determines the return to pathological values of exosmosis while the suppression of one of the other drugs, with relative specific action in the therapy of these diseases, does not change the electrolyte exosmosis from the skin. It is likely that the B_{12} vitamin acts on some physico-chemical systems at the level of the skin.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 249–256 (1970)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL L-ALANIN : 2-OXOGLUTARAT-AMINOTRANSFERAZEI VEGETALE

I. F. DUMITRU, DANA IORDĂCHESCU, S. NICULESCU și GABRIELA ȘERBAN

Rezumat. — În vederea selecționării unui material vegetal pentru studiul activității L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei au fost utilizate semințele diferitelor specii de leguminoase. Din pudra acetonică rezultată din semințele de soia și lupin au fost obținute extracte cu activitate L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazică mai mare decît de la alte leguminoase. Folosind soluții tampon care diferă după natura componentelor și după tăria ionică, au fost stabilite condițiile experimentale optime pentru extracția enzimei și pentru mersul reacției enzimatice. Activitatea enzimatică totală este concentrată în supernatant; în fracțiunea mitocondrială enzima nu a fost identificată. În timpul primelor 72 de ore de germinare, activitatea L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei scade.

Izolarea, studiul repartiției în celulă, purificarea și cristalizarea aminotransferazelor de origine vegetală au fost puțin abordate în literatura de specialitate.

Martinez-Carrion și Jenkins [1] sînt primii care au purificat și cristalizat D-alanin : D-glutamat-transaminaza din culturi de *Bacillus subtilis*. Cruickshank și Isherwood [2] au studiat glutamic-alanin-transaminaza și glutamic-aspartic-transaminaza din grîu. Acești autori, folosind procedeul precipitării cu sulfat de amoniu, au obținut un preparat parțial purificat, care întrunește activități catalitice specifice pentru cele două enzime. Ellis și Davies [3] reușesc o purificare a glutamic-oxalacetic-transaminazei din conopidă, efectuînd și studiul unor proprietăți fizico-chimice ale enzimei. Gamborg și Wetter [4] izolează și purifică din plantele tinere de fasole o aminotransferază aromatică [1].

Scopul prezentei lucrări constă în alegerea unui material vegetal mai bogat în proteină cu activitate L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazică, în stabilirea condițiilor experimentale optime pentru extracția L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei (EC2.6.1.2) din materialul ales, a repartiției enzimei la nivel celular, precum și în studiul unor proprietăți fizico-chimice ale enzimei pe extracte nepurificate.

---

[1] Pentru evitarea confuziilor, s-a menținut nomenclatura enzimelor utilizată de autori în lucrările citate de noi.

MATERIAL ŞI METODE

În scopul selecţionării unui material de studiu care să constituie o bună sursă pentru extracţia L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei am folosit seminţe din diferite specii de leguminoase (*Pisum sativum* ICA 53/54; *Phaseolus vulgaris* F.51-*Progres*; *Glycine hispida* var. *Chipeewa*; *Lupinus albus*; *Vicia faba minor*; *Cicer arietinum*).

Pentru extracţie, seminţele leguminoaselor au fost mojarate, degresate cu acetonă [5], iar din materialul degresat rezultat s-au extras proteinele cu soluţii tampon diferite, după natura componentelor şi tăria ionică. Pentru fiecare experienţă au fost utilizate cîte 2 g material degresat, extracţia efectuîndu-se în decurs de 60 de minute cu 40 ml soluţie tampon, la 4°C. Extractul a fost filtrat prin cîteva straturi de tifon şi centrifugat la 5 000 × g, timp de 30 de minute.

Pentru obţinerea mitocondriilor s-a utilizat procedeul descris de Jaarma [6], integritatea lor funcţională fiind explorată cu ajutorul metodei Warburg [7].

Proteinele au fost determinate cu ajutorul metodei Lowry şi colab. [8], rezultatele calculîndu-se în raport cu albumina serică bovină cristalizată, utilizată pentru obţinerea curbei etalon.

Activitatea L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei a fost determinată după metoda Rosen şi colab. [9], modificată de noi [10].

Activitatea specifică a enzimei a fost exprimată în unităţi EC I.U.B. : µmoli acid piruvic/mg proteină/min/38°C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei obţinute din pudra degresată a seminţelor diferitelor specii de leguminoase, prin extracţie cu soluţie tampon de Na_2HPO_4—KH_2PO_4, este redată în tabela 1.

Tabela 1

Activitatea L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei obţinute de la diferite specii de leguminoase

Specia utilizată	Proteină mg/ml	Activitatea enzimatică µmoli acid piruvic/ml /min/37°C	Activitatea specifică µmoli acid piruvic/mg proteină/ min/37°C
Pisum sativum	7,8	45,4	5,8
Phaseolus vulgaris var.51 — *Progres*	6,9	139,2	20,2
Glycine hispida var. *Chipeewa*	7,8	337,2	43,2
Cicer arietinum	6,9	196,8	28,5
Lupinus albus	8,0	411,8	51,4
Vicia faba var. *minor*	7,9	136,5	17,2

Extractul a fost realizat folosindu-se pentru fiecare 2 g pudră degresată cîte 40 ml soluţie tampon Na_2HPO_4-KH_2PO_4, $2 \cdot 10^{-1}$M, pH=7,5.

După cum reiese din tabela 1, prin utilizarea soluțiilor tampon de fosfați de potasiu și sodiu $2 \cdot 10^{-1}$ M, la pH=7,5 se depistează o activitate L-alanin: 2-oxoglutarat-aminotransferazică maximă în cazul extractelor de soia și lupin.

O activitate neînsemnată a acestei enzime a fost găsită în cazul extractului de mazăre; la bob, fasole și năut activitatea enzimei înregistrează valori de aproximativ 3—4 ori mai mari, însă inferioare celor găsite pentru extractele de soia și lupin. Din această cauză, pudrele acetonice obținute din semințele degresate de soia și lupin au fost folosite în experiențele următoare, în care s-a urmărit selecționarea celui mai adecvat tampon, atît pentru realizarea extracției optime a enzimei, cît și pentru mersul reacției enzimatice. Rezultatele unei experiențe tipice sînt redate în tabela 2.

Tabela 2

Activitatea L-alanin:2-oxoglutarat-aminotransferazei în extractele rezultate din pudrele acetonice de soia și lupin

Specia utilizată	Tampon	Proteină mg/ml	Activitatea enzimatică μmoli acid piruvic /ml/ min/37°C	Activitatea specifică μmoli acid piruvic/mg proteină /min/37°C
Glycine hispida var. *Chipeewa*	Tris-HCl	6,7	279,4	41,7
	$Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$	6,8	318,2	46,8
	$K_2HPO_4-KH_2PO_4$	6,7	360	53,7
	$Na_2HPO_4-KH_2PO_4$	6,0	189	31,5
	$Na_4P_2O_7-HCl$	5,9	236	40,0
Lupinus albus	Tris-HCl	5,9	27,14	4,6
	$Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$	6,3	325,7	51,7
	$K_2HPO_4-KH_2PO_4$	10,0	359,8	35,98
	$Na_2HPO_4-KH_2PO_4$	7,1	355	50,0
	$Na_4P_2O_7-HCl$	6,5	39	6,0

Extractele au fost obținute utilizîndu-se tampoane de natură diferită, însă de aceeași molaritate ($5 \cdot 10^{-3}$M, pH = 7,5.

Totodată s-a studiat și influența tăriei ionice a tamponului asupra extracției proteinelor și asupra activității enzimatice. Media mai multor determinări este redată în figura 1.

Comparînd rezultatele redate în tabela 2 și figura 1, se constată că, pe măsură ce tăria ionică a tamponului crește, activitatea specifică a enzimei în extracte scade, atît la extractele de soia, cît și la cele de lupin, și depinde de natura componentelor tamponului. Activitatea L-alanin: 2-oxoglutarat-aminotransferazei în extractele de soia este maximă cînd

se utilizează tamponul de fosfaţi de potasiu, mai mică în cazul utilizării tamponului de fosfaţi de sodiu şi minimă cînd se foloseşte tamponul de fosfaţi de sodiu şi potasiu.

În cazul extractelor de lupin, activitatea specifică maximă a enzimei a fost depistată în tamponul de fosfaţi de sodiu şi tamponul Na_2HPO_4—KH_2PO_4, după care urmează tamponul de fosfaţi de potasiu. În acest caz este mult mai evidentă influenţa tampoanelor Tris-HCl şi $Na_4P_2O_7$—HCl, în care activitatea enzimei înregistrează valori extrem de mici.

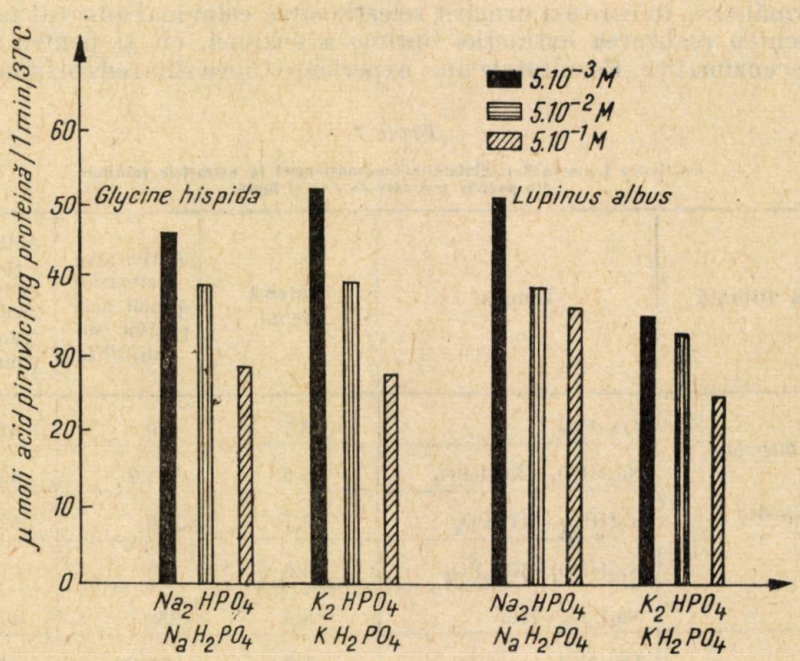


Fig. 1. — Influenţa tăriei ionice a tamponului de extracţie asupra activităţii L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei. Rezultatele sînt exprimate în μmoli acid piruvic/mg proteină/min/37°C.

Deoarece tamponul de fosfaţi de potasiu $5 \cdot 10^{-3}$M, pH = 7,5, utilizat la obţinerea extractelor de soia, permite realizarea celei mai bune extracţii a proteinelor cu activitatea aminotransferazică, acest tampon a fost folosit în experienţele ulterioare, menţinîndu-se constante condiţiile experimentale descrise mai sus.

S-a urmărit, de asemenea, şi repartiţia în celulă a enzimei studiate. În condiţiile de extracţie adoptate de noi, L-alan-n:2-oxoglutarat-aminotransferaza este depistată numai în supernatantul rezultat după centrifugarea omogenatului la 5 000 × g, timp de 30 de minute. Sedimentul reluat în soluţie tampon nu posedă o activitate enzimatică decelabilă prin metoda utilizată de noi. Pentru a preciza repartiţia enzimei în celulă, din supernatantul utilizat în experienţele precedente a fost separată fracţiunea mitocondrială.

Activitatea enzimatică găsită în mitocondrii, în supernatant și în apele de spălare a fracțiunii miticondriale este redată în tabela 3.

După cum se vede din tabela 3, aproape întreaga activitate specifică L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei este concentrată în supernatant, fracțiunea mitocondrială, după două spălări repetate, neposedînd o activitate L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazică.

Tabela 3

Repartiția L-alanin :2-oxoglutarat - aminotransferazei în diferite fracțiuni celulare obținute din extractele de soia

Fracțiunea celulară	Activitatea enzimatică μmoli acid piruvic/ml/min/37°C
Mitocondrii	0
Supernatant	365
Prima apă de spălare a fracțiunii mitocondriale	21
A doua apă de spălare a fracțiunii mitocondriale	0

Aceste rezultate sînt comparabile cu repartiția aceleiași enzime în țesuturile animale [11]. Totodată semnalăm că repartiția în celulă a L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei diferă de cea a L-aspartat: 2-oxoglutarat-aminotransferazei, care a fost depistată de alți autori atît în supernatant, cît și în mitocondrii [12], [13].

Utilizînd supernatantul, am stabilit factorii care condiționează manifestarea plenară a proprietăților catalitice ale enzimei.

Domeniul concentrațiilor de proteină în care există o proporționalitate între activitatea enzimatică și diluția enzimei este redat în figura 2.

Efectul temperaturii asupra activității enzimei este net exprimat. Activitatea maximă a L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei se înregistrează la 38°C. La 50°C enzima e total inactivă, iar la temperaturi inferioare celei optime de acțiune, de exemplu la 25°C, transaminarea se realizează numai într-o proporție de 60%. Conservarea enzimei la temperaturi mai mari de 10°C este însoțită de o micșorare treptată a activității sale, din care cauză operațiunile de izolare și purificare trebuie făcute la temperaturi cuprinse între 0 și 4°C.

Am studiat de asemenea influența concentrației ionilor de hidrogen asupra activității L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei, utilizînd extracte nepurificate.

În figura 3 este redată variația activității enzimei la diferite valori de pH, în soluție tampon K_2HPO_4/KH_2PO_4, $5 \cdot 10^{-3}$M, pH-ul optim de acțiune al enzimei studiate fiind 7,5, ceea ce este în concordanță cu datele din literatură [2].

Studiind activitatea enzimatică, exprimată în μmoli acid piruvic/mg proteină/37°C în decursul a 60 de minute de incubare, se constată că aceasta crește proporțional numai în primele 30 de minute (fig. 4). După ce echilibrul a fost atins, proporționalitatea dintre timpul de incubare și

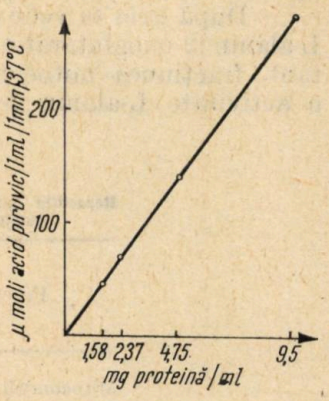


Fig. 2. — Activitatea L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei în funcție de concentrația proteinei în extract. Rezultatele sînt exprimate în µmoli acid piruvic/ml/min/37°C.

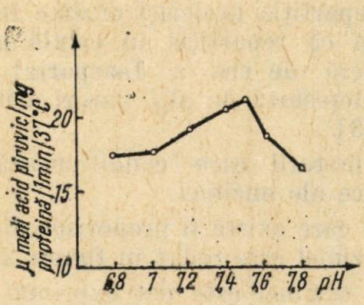


Fig. 3. — Activitatea enzimatică exprimată în µmoli acid piruvic/mg proteină/min/37°C la diferite valori de pH. Concentrația în proteină 0,550 mg/0,1 ml.

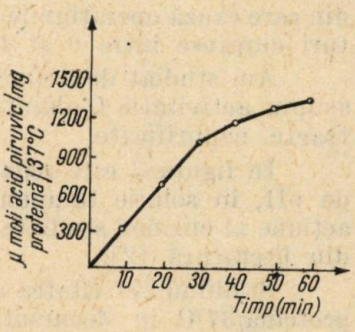


Fig. 4. — Variația activității L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei în timp. Concentrația în proteină 1,08 mg/0,1 ml.

activitatea enzimei nu mai este respectată, deoarece acidul piruvic — produs al reacţiei enzimatice, care este dozat — participă la reacţia enzimatică inversă [2].

Tabela 4

Variaţia activităţii L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei în cursul germinării la soia

Timp de germinare ore	Proteină mg/ml	Activitatea enzimatică µmoli acid piruvic/ml/ min/37°C	Activitatea specifică µmoli acid piruvic/mg proteină/min/ 37°C
24	11,4	262,2	23,0
48	12,2	474,6	38,9
72	11,8	321,0	27,2
Lot martor negerminat	11	627,0	57,0

Evoluţia activităţii L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei în seminţele de soia germinate la întuneric timp de 24, 48 şi 72 de ore arată că activitatea enzimatică scade în comparaţie cu lotul martor negerminat (tabela 4). Modificările activităţii enzimei sînt reproductibile de la o experienţă la alta şi nu sînt paralele cu schimbările survenite în concentraţia proteinelor[1].

CONCLUZII

1. Dintre speciile de leguminoase examinate în prezenta lucrare activitatea cea mai mare a L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferaze a fost găsită la seminţele de soia şi lupin.

2. Activitatea L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei din soia este maximă în soluţii tampon de $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$, $5 \cdot 10^{-3}$M, la pH = = 7,5 şi la 37°C.

3. Activitatea L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei în extractele enzimatice nepurificate, obţinute din soia, este localizată exclusiv în supernatant, în fracţiunea mitocondrială nefiind identificată.

4. În cursul primelor 72 de ore de germinare, activitatea L-alanin : 2-oxoglutarat-aminotransferazei se menţine scăzută faţă de aceea a unui lot martor negerminat.

Prezentat la redacţie la 25 decembrie 1969

Catedra de biochimie,
Facultatea de biologie,
Universitatea Bucureşti

[1] L. Riggio şi M. P. Gardella, într-o lucrare publicată în Atti Accad. Ligure Sci. Lett., **20**, 234 (1964) (citat după B.A., **48**, *18* (1967), au semnalat o creştere a activităţii L-alanin :2-oxoglutarat-aminotransferazei din leguminoasele germinate. Lucrarea nu ne-a fost accesibilă integral.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Martinez-Carrion, W. T. Jenkins, J. biol. Chem., **240**, 3538 (1965).
2. D. H. Cruickshank, F. A. Isherwood, Biochem. J., **69**, 189 (1958).
3. R. J. Ellis, D. D. Davies, Biochem. J., **78**. 615 (1961).
4. O. L. Gamborg, L. R. Wetter, Canad. J. Biochem. Physiol., **41**, 1733 (1963).
5. J. L. Bailey, *Techniques of Protein Chemistry*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam — Londra — New York, 1967, p. 280.
6. M. Jaarma, Acta chem. scand., **21**, 2069 (1967).
7. W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and tissue metabolism*, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1951, p. 1—16.
8. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
9. F. Rosen, N. R. Roberts, C. A. Nichol, J. biol. Chem., **234**, 476 (1953).
10. I. F. Dumitru, D. Iordăchescu, S. Niculescu, Rev. roum. Biochim., **7**, 31 (1970).
11. J. H. Wilkinson, în *Isoenzymes*, sub red. F. N. Spon, Ltd., Londra, 1965, p. 102.
12. J. W. Boyd, Biochem. J., **81**, 434 (1961).
13. H. Wada, Y. Morino, *Vitamins and Hormones*, în *Advances in research and applications*, sub red. R. S. Harris, J. G. Wool, J. A. Loraine, Acad. Press, New York — Londra, **22**, 411 (1964).

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF PLANT L-ALANINE : 2-OXOGLUTARATE-AMINOTRANSFERASE

SUMMARY

In order to select a plant material for the investigation of L-alanine : 2-oxoglutarate-aminotranspherase activity, different species of leguminous plants were utilised. From the acetonic powder resulted from soya and lupin seeds, extracts with a L-alanine :2-oxoglutarate-aminotransferase activity much greater than from other leguminous, were obtained.

By using buffer solutions which differ in components and ionic strenghts optimal experimental conditions were established for enzyme extraction and progress of enzymatic reaction.

The total enzymatic activity is concentrated in the supernatant; the enzyme was not identified in the mitochondrial fraction.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 257–260 (1970)

CERCETĂRI IMUNOELECTROFORETICE ASUPRA UNOR FRAGMENTE ELIBERATE DIN REGIUNEA Fc PRIN HIDROLIZA IMUNOGLOBULINEI G DE IEPURE CU PAPAINĂ ŞI PEPSINĂ

CORINA DRAGOMIRESCU

Rezumat. — Hidroliza cu papaină, respectiv pepsină, a IgG de iepure la pH = 4,5 a avut ca rezultat desprinderea din regiunea Fc a fragmentelor Fc′, respectiv Pep III′, care diferă între ele numai prin cîţiva aminoacizi aşezaţi la capătul lor N-terminal. Relaţiile de antigenicitate şi caracterele electroforetice ale celor două fragmente au fost cercetate cu ajutorul tehnicii imunoelectroforetice. Fragmentele Fc′ şi Pep III′ sînt identice din punctul de vedere al structurii lor antigenice, dar diferă prin sarcina electrică, Fc′ avînd o mobilitate electroforetică mai mare ca Pep III′.

Papaina este capabilă să detaşeze din extremitatea C-terminală a fragmentului Fc, la un pH acid [1], [2], un fragment cu greutatea moleculară 25 000, care a primit denumirea de fragment Fc′.

Pepsina scindează lanţul H în cîteva subunităţi mai mici, printre care se distinge fragmentul denumit Pep III′, cu greutatea moleculară 25 000, care a fost plasat înspre capătul C-terminal al fragmentului Fc [3].

Prahl [1] a arătat că fragmentele Fc′ şi Pep III′, izolate din IgG de iepure, au proprietăţi fizico-chimice şi imunochimice similare, apreciind că ele desemnează unul şi acelaşi fragment. Turner şi colab. [4] au analizat secvenţa unor porţiuni din fragmentele Fc′ şi Pep III′ izolate din IgG umană şi au ajuns la concluzia că fragmentul Pep III′ diferă de fragmentul Fc′ la capătul său N-terminal. Astfel, fragmentul Fc′ conţine la capătul său N-terminal un rest de acid glutamic (poziţia 105 de la capătul C-terminal), în timp ce Pep III′ are ca aminoacid N-terminal izoleucina (poziţia 116 de la capătul C-terminal). Rezultă că pepsina scindează o legătură peptidică aflată mai spre capătul N-terminal al fragmentului Fc, altfel decît o face papaina, şi din această cauză cele două fragmente nu sînt complet identice. Deoarece cele două fragmente diferă unul de celălalt prin capătul lor N-terminal şi deoarece această parte conţine, la iepure, aminoacizi cu o sarcină electrică diferită, ne-am propus să cercetăm relaţiile de antigenicitate şi caracterele electrocinetice ale fragmentelor Fc′ şi Pep III′, cu ajutorul tehnicii imunoelectroforetice.

Analiza imunoelectroforetică permite compararea proprietăţilor antigenice şi electrice a două proteine, cu condiţia folosirii unui antiser capabil să reacţioneze cu ambii parteneri. În acest scop am utilizat un ser

imun antifragment Fc, capabil să reacționeze atît cu fragmentul intact, cît și cu cei doi componenți, Fc′ și Pep III′, care se eliberează din Fc în urma acțiunii papainei și pepsinei.

MATERIAL ȘI METODE

Prepararea IgG de iepure. S-a pornit de la un amestec de seruri de iepure, din care s-a obținut IgG pură prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$, la o saturare de 33% și prin cromatografie pe DEAE-celuloză, cu tampon fosfat 0,02 M, pH = 8,0.

Hidroliza IgG cu pepsină. S-a făcut o soluție de IgG 2% în tampon acetat 0,2 M, pH = 4,5. S-a adăugat pepsină (3 × cristalizată, Koch-Light), într-un raport de 2 mg enzimă/100 mg proteină, și s-a incubat timp de 24 de ore la 37°C. După încheierea hidrolizei s-a adus la pH = 8,0, cu NaOH 0,5 N, și s-a analizat imunoelectroforetic.

Hidroliza IgG cu papaină. S-a făcut o soluție de IgG 1,5% în tampon acetat 0,05 M, pH = 4,5, care conținea 5 mM β-mercaptoetanol. S-a adăugat papaină (3 × cristalizată, N.B.C.), într-un raport de 1 parte enzimă/100 părți proteină. S-a incubat 24 de ore la 37°C, s-a adus la pH = 8,0, cu NaOH 0,5 N, și s-a analizat imunoelectroforetic. Ca probă de referință s-a utilizat un hidrolizat de IgG cu papaină, la pH = 5,5, în prezența de cisteină 0,01 M și EDTA 0,002 M [2], incubat timp de 5 ore la 37°C.

Analiza imunoelectroforetică. Electroforeza a durat 2 ore, la un potențial de 6 V/cm, în tampon veronal-veronal sodic de pH = 8,6, $\mu = 0{,}05$ (în plăci) și 0,016 (în gel). S-a utilizat un ser de oaie antifragment Fc de iepure, care reacționează cu Fc, Fc′ și conține de asemenea anticorpi față de fragmentul Fab. El ne-a fost pus la dispoziție de dr. M. Waldesbuhl de la Institutul de biochimie din Lausanne.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În figura 1 sînt prezentate analizele imunoelectroforetice ale hidrolizatelor de IgG de iepure cu papaină și pepsină.

Prezența în ambele hidrolizate a fragmentelor Fc′ și Pep III′ este relevată prin arcul de precipitare cu mobilitatea cea mai mare. Fragmentul Fab are o mobilitate mai mare decît fragmentul Fc [5], dar mai mică decît fragmentele Fc′ sau Pep III′ (fig. 1*a* și *b*). Apariția arcului de precipitare caracteristic fragmentului Pep III′ coincide cu dispariția arcului de precipitare pentru fragmentul Fc. Astfel, analizînd probe alicote luate din hidrolizatul peptic, la 2 și 5 ore, se constată că pentru desfacerea completă a fragmentului Fc sînt necesare 24 de ore (fig. 1*c* și *b*).

Comparînd mobilitatea electroforetică a fragmentului Fc′ cu aceea a fragmentului Pep III′, apare evident că ultimul are o încărcare electrică totală mai mică. Acest lucru s-a demonstrat clar cu ajutorul unei tehnici imunoelectroforetice comparative, în care zona de etalare electroforetică a antigenelor s-a închis într-un șanț dreptunghiular, umplut cu ser anti-Fc. Rezultatele sînt prezentate în figura 2.

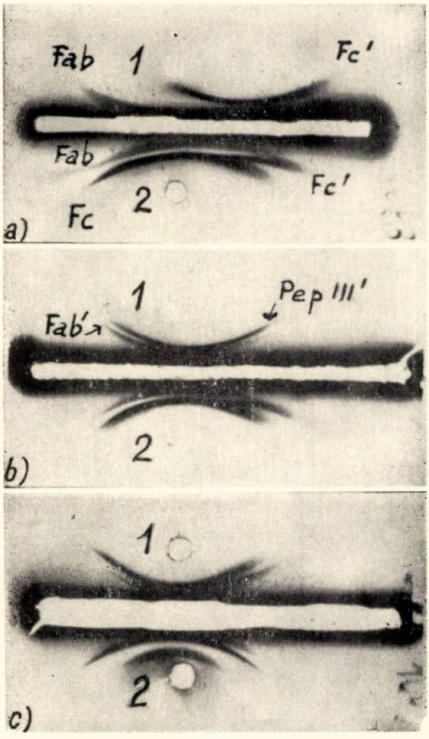


Fig. 1. — Imunoelectroforeza hidrolizatelor de IgG cu papainã şi cu pepsinã la pH = 4,5.

a — *1*) Hidrolizat cu papainã; *2*) hidrolizat de referinţã (papainã, pH = 5,5).
b — *1*) Hidrolizat cu pepsinã; *2*) hidrolizat de referinţã.
c — *1*) Hidrolizat de referinţã; *2*) hidrolizat cu pepsinã 5 ore.
Ser imun de oaie anti-Fc de iepure.

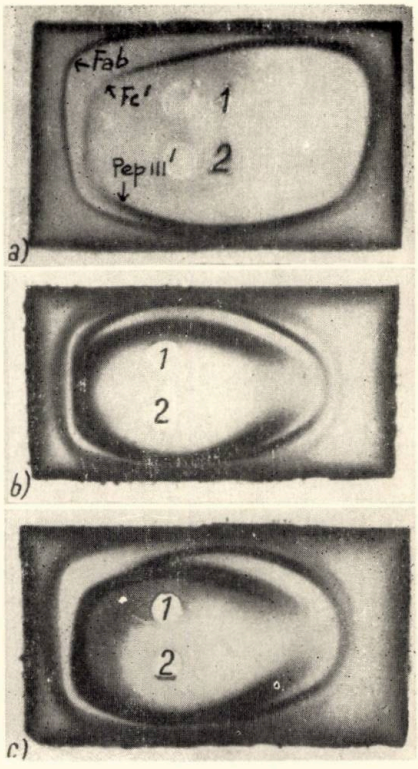


Fig. 2. — Imunoelectroforeza comparativã a hidrolizatelor de IgG cu papainã şi pepsinã la pH = 4,5.

a — *1*) Hidrolizat cu papainã; *2*) hidrolizat cu pepsinã.
b — *1*) Hidrolizat cu pepsinã; *2*) hidrolizat de referinţã.
c — *1*) Hidrolizat cu papainã; *2*) hidrolizat de referinţã.
Ser imun de oaie anti-Fc de iepure.

Se remarcă fără nici o dificultate că fragmentul Pep III′ este identic, din punct de vedere antigenic, cu fragmentul Fc′ (liniile de precipitare fuzionează complet), dar că mobilităţile lor electroforetice sînt net deosebite, fragmentul Fc′ avînd o mobilitate electroforetică mai mare (fig. 2*a*). Raporturile antigenice dintre fragmentele Pep III′ şi Fc′, pe de o parte, şi fragmentul Fc, pe de altă parte, se observă din diagramele în care se compară hidrolizatele peptic şi papainic, la pH = 4,5, cu hidrolizatul de referinţă obţinut prin hidroliza cu papaină la pH = 5,5 (fig. 2*b* şi *c*). Se observă pătrunderea şi fuzionarea liniilor Fc′ şi Pep III′ cu linia Fc, care apare în jurul godeului în care s-au aplicat cele două hidrolizate analizate. Este de notat că apariţia liniei Fc între godeul cu hidrolizatele papainic şi peptic şi antiser se datoreşte difuziei acestui fragment din godeul învecinat, în care s-a aplicat hidrolizatul de referinţă. Această situaţie poate fi uşor sesizată dacă se urmăreşte aşezarea celor două linii Fc în jurul celor două godeuri; se observă o aşezare asimetrică, ceea ce dovedeşte că în cele două hidrolizate, cu papaină şi pepsină, nu mai există fragment Fc, acesta fiind complet convertit în fragmente Fc′, respectiv Pep III′.

Reacţia de identitate totală dintre fragmentele Fc′ şi Pep III′, confruntată cu sarcina lor electrică complet diferită, ne face să afirmăm că cele două fragmente diferă prin aminoacizii de la capătul N-terminal, care nu conferă însă şi o antigenicitate în plus moleculei care îi conţine. Această diferenţă ar putea fi similară cu cea constatată la IgG de om şi concretizată prin aceea că în această zonă cele două enzime lucrează asupra a două legături peptidice diferite, dar aşezate la o distanţă mică, de numai cîteva legături peptidice. Aminoacizii pe care îi posedă în plus unul din cele două fragmente (probabil fragmentul Pep III′ [47]) nu cuprind nici o grupare determinantă faţă de care antiserul folosit să posede anticorpi. De aceea, cele două fragmente nu au putut fi distinse din punctul de vedere al structurii lor antigenice.

Componentele proteice care provin din capătul N-terminal al fragmentului Fc (Pep IV şi Pep V în hidrolizatul cu pepsină) [3] nu au putut fi puse în evidenţă, fie deoarece antiserul nostru nu conţine anticorpi faţă de determinanţii antigenici ai acestor componente, fie deoarece ele sînt prea mici ca să dea o reacţie de precipitare.

CONCLUZII

Prin hidroliza cu papaină şi pepsină a IgG de iepure se desprind din regiunea Fc fragmentele Fc′, respectiv Pep III′, care diferă numai prin cîţiva aminoacizi de la capătul N-terminal.

Aminoacizii pe care îi posedă în plus unul din cele două fragmente nu conferă însă şi un plus de antigenicitate moleculei care îi conţine.

Prezentat la redacţie la 28 februarie 1970

Laboratorul de imunochimie,
Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. W. PRAHL, Biochem. J., **104**, 647 (1967).
2. V. GHEȚIE, C. MOTAȘ, S. MIHĂESCU, Rev. roum. Biochim., **6**, 29 (1969).
3. S. UTSUMI, Biochem. J., **112**, 343 (1969).
4. M. W. TURNER, L. MARTENSSON, J. B. NATVIG, H. BENNICH, Nature, **221**, 1166 (1968).
5. V. GHEȚIE, Rev. roum. Biochim., **5**, 121 (1968).

IMMUNOELECTROPHORETIC STUDIES OF SOME FRAGMENTS RELEASED FROM THE Fc REGION OF RABBIT IgG FOLLOWING PAPAIN AND PEPSIN DIGESTION

SUMMARY

Digestion of rabbit IgG with papain or pepsin at pH = 4.5 released from the Fc region the Fc′ and Pep III′ fragments respectively, differing from one another but with some aminoacids located in their N-terminal part.

The relationships of antigenicity and the electrokinetic characters of the two fragments were studied by immunoelectrophoretic techniques.

The Fc′ and Pep III′ fragments are identical concerning their antigenic structure, but different by the electrical charge, the Fc′ fragment having a greater electrophoretic mobility than Pep III′.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 261–264 (1970)

ELIBERAREA TREPTATĂ A APEI ŞI A ALTOR COMPONENTE DIN MATERIA BIOSTRUCTURATĂ A FRUNZELOR DE PORUMB, SUB ACŢIUNEA AZIDEI DE SODIU

VIORICA ELEFTERESCU

Rezumat. — S-a urmărit eliberarea apei, a substanţelor hidrosolubile şi a ionilor de potasiu şi calciu din biostructura frunzelor de porumb, sub acţiunea azidei de sodiu. S-a constatat că, pe măsură ce concentraţia soluţiei de azidă de sodiu creşte, se obţine o cantitate din ce în ce mai mare de suc, mai bogat în substanţe hidrosolubile şi în ioni de potasiu şi calciu. Eliberarea componentelor menţionate are loc în „trepte", ceea ce demonstrează existenţa în biostructură a unor linii de „clivaj" de rezistenţe diferite, susceptibile să se destrame sub influenţa inhibitorilor metabolici.

Într-o lucrare precedentă [1] s-a constatat că frunzele de porumb tratate cu dinitrofenol şi azidă de sodiu cedează o cantitate mai mare de suc, de ioni de sodiu, potasiu şi calciu, precum şi de fosfor anorganic decît frunzele plantelor martor. Aceasta înseamnă că în prezenţa inhibitorilor menţionaţi se produce destrămarea parţială a biostructurii, eliberîndu-se o parte din componentele părţii biostructurate a ţesutului viu respectiv.

Cum existenţa biostructurii necesită un aport de energie metabolică ([2], [3], p. 243) şi cum inhibitorii metabolici scad producerea acestei energii [4] şi frînează desfăşurarea anumitor procese biochimice din organism, înseamnă că în prezenţa inhibitorilor metabolici stabilitatea biostructurii scade, ceea ce duce la destrămarea ei parţială.

În privinţa procesului destrămării, teoria biostructurii prevede că „la această destrămare şi la modul cum se produce ea contribuie aşezarea neuniformă a componentelor biostructurii şi deci repartiţia neuniformă a forţelor care leagă componentele respective. De aici, existenţa în biostructură a unor linii de clivaj, unele mai rezistente, iar altele... susceptibile de a se desface mai uşor. Cum trecerea de la o linie de «clivaj» la alta nu poate fi continuă, este de aşteptat ca cel puţin în anumite împrejurări destrămarea biostructurii să se facă în «trepte»... Observăm că situaţia liniilor de clivaj nu este fixă, ci se schimbă în funcţie de starea şi condiţiile de existenţă a biostructurii") ([3], p. 69).

Este evident că în prezenţa inhibitorilor metabolici se destramă în primul rînd acele straturi ale biostructurii ale căror componente sînt mai slab legate între ele. Menţinerea în biostructură a acestor componente necesită deci o cantitate mică de energie, iar desprinderea lor în biostructură poate fi provocată de o cantitate mică de inhibitori. În al doilea rînd

se destramă acele straturi ale biostructurii ale căror componente sînt mai puternic legate între ele. Pentru menţinerea acestora în biostructură este necesară o cantitate mare de energie, iar desprinderea lor din biostructură poate fi provocată de o cantitate mare de inhibitori.

Dacă această prevedere este justă, ar fi de aşteptat ca, folosind inhibitori metabolici în concentraţii progresive, să putem constata eliberarea în „trepte" măcar a unora dintre componentele biostructurii.

Pentru a verifica această ipoteză, am introdus în plantule de porumb soluţii de azidă de sodiu în concentraţii progresive şi am urmărit cantitatea de suc eliberată, concentraţia lui globală, precum şi concentraţia ionilor de potasiu şi calciu.

MATERIAL ŞI METODĂ

Am lucrat pe plantule de porumb (hibrid simplu 301) în vîrstă de 12—14 zile, crescute atît în condiţii de lumină artificială (decembrie, ianuarie, februarie), cît şi în condiţii naturale (mai, iunie, iulie). Plantulele se tăiau de la colet, se legau în mănunchiuri de cîte 50 g şi se introduceau cu tulpinile în soluţii apoase de azidă de sodiu avînd concentraţii cuprinse între 3 şi 650 mg/100 ml. După 24 de ore, partea care era introdusă în soluţie se spăla cu apă distilată şi se usca prin tamponare cu hîrtie de filtru, apoi plantulele se storceau într-o presă hidraulică de laborator tip Hafico, model 21, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantităţi mici. Presiunea se ridica treptat pînă la 150 atm şi se menţinea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc (15 min erau în general de ajuns). După măsurarea volumului şi centrifugarea sucului la 12 000 rot/min, timp de 30 min, se determina indicele de refracţie cu refractometrul Abbé, model Carl Zeiss Jena, iar concentraţia se exprima convenţional în g zaharoză la 100 ml suc, după tabelele lui Wagner [5]. Apoi sucul se dilua 1/10 cu apă bidistilată şi se determina concentraţia ionilor de potasiu şi calciu la fotometrul cu flacără model III, Carl Zeiss Jena.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din examinarea datelor obţinute (v. tabela 1) reiese că, pe măsură ce concentraţia soluţiei de azidă de sodiu cu care s-au tratat plantulele creşte, cantitatea de suc ce se stoarce din frunze, concentraţia globală a acestui suc, precum şi cantităţile ionilor de potasiu şi calciu sînt în general mai mari şi depăşesc valorile care corespund sucului obţinut din frunzele plantulelor martor, tratate numai cu apă. Explicăm apariţia acestui surplus al apei şi al celorlalte componente prin destrămarea biostructurii în prezenţa azidei de sodiu. Ceea ce însă atrage atenţia în mod deosebit este faptul că între anumite limite de concentraţie ale azidei de sodiu, destul de largi, se eliberează din biostructură una şi aceeaşi cantitate de apă, respectiv de ioni.

Astfel, soluţiile azidei de sodiu, de concentraţii cuprinse între 19 şi 55 mg/100 ml, deşi diferite, provoacă totuşi eliberarea aproximativ a aceleiaşi cantităţi de apă biostructurală, de 7—9 ml. La fel, soluţiile azidei

Tabela 1

Concentraţia soluţiei de azidă (mg/100 ml), cantitatea de suc (ml), cantitatea de suc eliberat (ml) (diferenţa dintre sucul eliberat de frunzele plantelor martor tratate numai cu apă şi sucul eliberat de frunzele plantelor tratate cu azida de sodiu), indicii de refracţie (n_D), concentraţia sucului în substanţe hidrosolubile exprimată în zaharoză (g/100 ml), cantitatea substanţelor hidrosolubile exprimată în zaharoză (g), cantitatea substanţelor hidrosolubile eliberată exprimată în zaharoză (g), ioni de potasiu în suc (mg), ioni de potasiu eliberaţi (mg), ioni de calciu în suc (mg), ioni de calciu eliberaţi (mg)

Nr. crt.	N_3Na mg/ 100 ml	Suc ml	Suc eliberat ml	n_D	Substanţe hidrosolubile (zaharoză)			K		Ca	
					g/100 ml	g	eliberată g	mg	ioni eliberaţi mg	mg	ioni eliberaţi mg
1	0	12	—	1,3360	1,9602	0,235	—	18	—	6	—
2	3	15	3	1,3356	1,6660	0,249	0,014	18	0	7	1
3	6	16	4	1,3356	1,6660	0,266	0,031	19	1	8	2
4	10	17	5	1,3356	1,6660	0,283	0,048	21	3	9	3
5	13	18	6	1,3360	1,9602	0,353	0,118	23	5	9	3
6	16	18	6	1,3360	1,9602	0,353	0,118	23	5	10	4
7	19	19	7	1,3363	2,2977	0,436	0,202	26	8	11	5
8	26	20	8	1,3364	2,2430	0,448	0,214	27	9	12	6
9	32	20	8	1,3365	2,3112	0,462	0,227	27	9	11	5
10	39	19	7	1,3359	1,8900	0,359	0,184	23	5	17	11
11	46	20	8	1,3361	2,0304	0,406	0,171	24	6	16	10
12	49	20	8	1,3361	2,0304	0,406	0,171	26	8	19	13
13	52	21	9	1,3366	2,3814	0,500	0,265	27	9	19	13
14	55	20	8	1,3365	2,3112	0,462	0,227	25	7	16	10
15	59	22	10	1,3365	2,3112	0,508	0,273	33	15	17	11
16	65	23	11	1,3365	2,3112	0,531	0,296	40	22	18	12
17	162	24	12	1,3369	2,5947	0,632	0,397	47	29	18	12
18	260	25	13	1,3379	3,3021	0,825	0,591	52	34	20	14
19	455	26	14	1,3378	3,2319	0,840	0,705	51	33	21	15
20	650	25	13	1,3382	3,5100	0,877	0,643	61	43	20	14

Datele din tabelă reprezintă medii din cîte patru serii de experienţe.

de sodiu, care cuprind între 260 şi 650 mg/ml, eliberează de asemenea o aceeaşi cantitate de apă biostructurală, de data aceasta mai mare, şi anume de 13—14 ml. Numai celelalte soluţii ale azidei de sodiu, ale căror concentraţii nu se încadrează în limitele menţionate, determină o eliberare cu atît mai mare a apei biostructurale, cu cît sînt mai concentrate. Prin urmare, în procesul eliberării apei din biostructura ţesutului foliar de porumb sub acţiunea azidei de sodiu se constată existenţa a două trepte, situate la două nivele diferite.

Constatări asemănătoare se desprind şi din examinarea datelor privitoare la substanţele hidrosolubile, precum şi la ionii de potasiu. În ambele cazuri apar de asemenea două trepte, între aceleaşi limite ale concentraţiilor azidei de sodiu, şi anume între 19 şi 55 şi 260 şi 650 mg/100 ml. Deci, eliberarea din biostructura frunzelor de porumb a apei, a substanţelor hidrosolubile, precum şi a ionilor de potasiu se face simultan din acelaşi strat.

În cazul ionilor de calciu, situaţia este oarecum diferită. Astfel în procesul eliberării acestora se constată trei trepte dintre care două nu coincid cu cele constatate la eliberarea apei, a substanţelor hidrosolubile

şi a ionilor de potasiu, şi anume prima corespunde unei concentraţii a soluţiei de azidă de sodiu cuprinse între 19 şi 32 mg/100 ml, a doua între 39 şi 162 mg/100 ml, iar ultima, care corespunde unei concentraţii cuprinse între 260 şi 640 mg/100 ml, coincide cu ultima treaptă constatată în cazul apei, al substanţelor hidrosolubile şi al ionilor de potasiu.

Faptul că eliberarea de apă, de substanţe hidrosolubile şi de ioni de potasiu şi calciu din biostructura frunzelor de porumb sub influenţa diferitelor concentraţii ale soluţiei de azidă de sodiu are loc în „trepte" este o confirmare a justeţei prevederilor teoriei biostructurii.

CONCLUZII

Rezultatele obţinute dovedesc existenţa în biostructură a unor straturi orientate după anumite linii de „clivaj", de rezistenţe diferite, care pentru menţinerea lor au nevoie de cantităţi de energie diferite, iar pentru destrămarea lor de cantităţi diferite de inhibitori metabolici.

Prezentat la redacţie la 1 aprilie 1970

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
2. E. Macovschi, *Materia vie şi geneza ei*, Contemporanul nr. 34, august, 1958; *Materialismul dialectic şi ştiinţele contemporane ale naturii*, Edit. politică, Bucureşti, 1959.
3. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
4. D. P. Hackett, *Respiratory inhibitors*, W. Ruhland, în *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, vol. XII, partea a 2-a, Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1960, p. 23.
5. B. Wagner, *Tabellen zum Eintauchrefraktometer*, Sonderhausen, 1907, p. VIII şi 46.

STEPWISE RELEASE OF SOME COMPONENTS FROM THE BIOSTRUCTURE OF MAIZE LEAVES UNDER THE INFLUENCE OF SODIUM AZIDE

SUMMARY

The sodium azide induced release of water-soluble compounds and K^+ and Ca^{++} ions from the biostructure of maize leaves, was followed. The higher is the concentration of sodium azide solution, the greater is the yield of sap, which is also more concentrated in water soluble compounds and K^+ and Ca^{++}.

The release of water and other mentioned compounds occur "in step" proving that there are in the biostructure some "lives of cleavage" of different strengths, liable to breaking, under the influence of metabolic inhibitors.

ST. CERC. BIOCHIM. 13, 3, 265 – 273 (1970)

PĂSTRAREA FRAGMENTELOR DE ANTIGEN ÎN SITUSURILE DE COMBINARE ALE SUBUNITĂȚILOR DE ANTICORP REZULTATE DIN HIDROLIZA ȘI REDUCEREA COMPLEXELOR IMUNE

V. GHEȚIE, L. BUZILĂ și S. MIHĂESCU

Rezumat. — S-a hidrolizat cu pepsină complexul imun (^{131}I) albumină serică umană — anticorpi de iepure antialbumină și s-a separat prin filtrare pe Sephadex G-150 fragmentul Fab'. Fragmentul Fab' obținut este radioactiv, semn că în situsul de combinare se păstrează un fragment de albumină radioactiv. Reducerea și alchilarea fragmentului Fab' în prezență de uree și filtrarea pe Sephadex G-100 duc la separarea fragmentului Fd' de lanțul L. Analiza radioimunoelectroforetică arată că numai linia de precipitare dată de fragmentul Fd' este radioactivă. Radioactivitatea legată de Fd' reprezintă 10% din radioactivitatea totală.

Cercetările de marcare prin afinitate (*affinity labelling*), efectuate cu un număr destul de mare de haptene, au condus la concluzia că situsul de combinare al anticorpilor este localizat atît pe lanțul H, cît și pe lanțul L [1]. Această concluzie concordă cu rezultatele obținute mai de mult de Franek și Nezlin [2] și de Edelman și colab. [3], care au arătat că pentru refacerea unui situs de combinare, anulat prin disocierea lanțurilor grele de cele ușoare, sînt necesare ambele lanțuri, lanțul H avînd însă o participare mai mare. Karush [4] a susținut ideea, la care s-au raliat destui cercetători [5], că lanțul greu are înscrisă în molecula sa o secvență specifică de cîțiva aminoacizi, care îi conferă capacitatea de a lega antigenul corespondent, și că lanțul L asigură situsului de combinare o conformație spațială definită, care îngăduie ca între aminoacizii situsului de combinare din lanțul H și aminoacizii sau glucidele antigenului să se stabilească legături de tip imun.

Aceste idei nu concordă cu datele obținute prin marcarea prin afinitate, considerată în prezent ca cea mai de încredere metodă. Discrepanța rezultatelor poate fi explicată dacă analizăm mecanismul prin care haptenele se fixează de situsul de combinare. În tehnica marcării prin afinitate, concentrația haptenei este maximă în zona situsului de combinare și de aceea există o probabilitate mult mai mare ca haptena să se fixeze chimic de un aminoacid din situsul de combinare decît de unul din afara lui. Dar în situsul de combinare pot fi implicate, ca regulatoare de conformație, porțiuni din lanțul L, fără ca acestea să aibă propriu-zis o secvență complementară grupării antigenice. În consecință, de aceste porțiuni se vor putea lega haptenele ce se concentrează în situsul de combinare, lanțul L putînd astfel să apară marcat fără a fi implicat direct în situs. Această

comportare pare cu atît mai probabilă cu cît, la majoritatea haptenelor folosite, gruparea chimică activă care se leagă de anticorp nu este și grupa-rea determinantă a haptenei, ea găsindu-se într-o parte a moleculei care poate fi mascată de proteina suport, neintrînd în contact cu sistemul anticorpo-formator.

În consecință, experiențele de marcare prin afinitate nu arată care din lanțurile ce compun molecula anticorpilor are o porțiune cu o secvență complementară antigenului, ci numai că situsul de combinare este alcătuit din ambele lanțuri. Deci, metoda nu poate preciza care este gradul partici-pării celor două lanțuri polipeptidice, H și L, la alcătuirea situsului de combinare și cu atît mai puțin care anume este funcția îndeplinită de fie-care porțiune de lanț implicată în situs. De aceea, apare utilă continuarea cercetărilor care să adîncească interacțiunea subunităților de anticorp, rezultate din desfacerea moleculei inițiale, cu antigenul corespondent. Această interacțiune poate fi studiată fie utilizînd subunități de anticorp purificate și făcîndu-le să interacționeze cu antigenul, fie urmărind regiu-nile din molecula anticorpului de care antigenul rămîne atașat în cursul operațiunilor de micșorare a moleculei, realizate prin mijloace enzimatice și chimice.

Aceste două căi de cercetare nu sînt echivalente, deoarece în al doilea caz legătura dintre antigen și anticorp poate rezista proceselor de scin-dare, mai ales dacă antigenul este suficient de mic, în timp ce separarea lanțurilor și alte operații legate de micșorarea moleculei ar putea să modi-fice configurația produșilor rezultați, făcîndu-i neapți de a mai lega ulte-rior antigenul.

Noi am efectuat experiențe de legare a albuminei serice umane de lanțuri și fragmente obținute din anticorpi de iepure antialbumină [6] și am ajuns la concluzia că, dintre cele două componente ale fragmentului Fab cu proprietăți de anticorp, anume lanțul L și fragmentul Fd, numai acesta din urmă este capabil să fixeze antigenul. Am arătat că capacitatea de legare a antigenului de fragmentul Fd se păstrează cu atît mai bine, cu cît acesta se obține prin mai puține operații. Această ultimă constatare arată că rezervele noastre, formulate mai sus, privitoare la modul în care operațiile de izolare pot influența activitatea subunităților obținute sînt pe deplin justificate.

Apărea util de urmărit acum, pe același sistem albumină serică umană — anticorp de iepure specific, care anume sînt fragmentele de care rămîne atașat antigenul în urma digestiei enzimatice a complexului imun și în urma separării fragmentelor după reducerea chimică a subunităților. În acest scop am supus complexul imun la o hidroliză peptică ce avea un dublu efect : micșora molecula albuminei pînă la fragmente cu greutate moleculară mică și elibera din molecula anticorpului fragmente Fab' cu un situs de combinare în moleculă. Scindarea concomitentă a albuminei și a anticorpului face ca în situsul de combinare al fragmentului Fab' să rămînă, în afara grupărilor determinante, numai o mică porțiune din molecula de albumină, astfel că forțele ce le mențin în situs sînt suficient de puternice pentru a rezista tratamentului pe care-l pretinde obținerea subunităților. Desigur că fragmentul de albumină ce rămîne în situsul de combinare trebuie să păstreze măcar un rest de tirozină cu ^{131}I, pentru

ca distribuția fragmentului între diferitele subunități de anticorp să poată fi urmărită radiometric.

Experiențe de scindare a complecșilor cu papainã au fost făcute de numeroși cercetători [7]—[10], în scopuri diferite de cele ale cercetării noastre. În experiențele lor, ei au putut arăta că, conform așteptărilor, antigenele folosite (albumină serică, ovalbumină) rămîneau atașate de fragmentul Fab, dar nu și de fragmentul Fc. Ei nu au urmărit însă mai departe care este participarea fragmentului Fd și a lanțului L la menținerea antigenului în situsul de combinare al fragmentelor Fab. Cu acest lucru ne-am însărcinat noi în lucrarea de față.

MATERIAL ȘI METODE

Marcarea albuminei serice umane cu ^{131}INa. S-a făcut un amestec de reacție compus din 0,1—0,35 ml soluție de ^{131}INa (1 mCi), 1,00 ml soluție IK 0,01 N, 0,6 ml HCl 0,5 N și 0,6 ml soluție de $NaNO_2$ 0,1 N. Soluția s-a colorat în brun-roșcat. S-a aspirat într-o pipetă Pasteur cu vîrf capilar și s-a amestecat în jet cu 2,3—2,55 ml soluție ce conține 50—100 mg serumalbumină umană, dizolvată în tampon carbonat 0,2 M, pH 9,2. S-a lăsat amestecul la temperatura camerei 30 min, apoi s-a gel-filtrat peste o coloană de Sephadex G-25 de 30/1,5 cm, eluată cu NaCl 0,145 M. S-a determinat randamentul iodurării prin măsurarea radiactivității totale și a celei legate de albumină. S-au găsit valori în jur de 20%, ceea ce, ținînd seama de cantitatea de iodură folosită ($1{,}9 \cdot 10^{-3}$ M) și de proteină supusă iodurării ($3{,}8 \cdot 10^{-4}$ M), reprezintă un atom de iod legat de o moleculă de albumină.

Imunizarea animalelor. Au fost imunizate trei loturi de iepuri: un lot de 6 iepuri și două loturi de cîte 10 iepuri fiecare. La toate animalele s-a utilizat aceeași schemă de imunizare. Prima injecție a fost făcută subcutan cu 10 mg albumină serică umană în asociație cu adjuvant Freund. După trei săptămîni s-a repetat injecția subcutan, tot cu 10 mg albumină serică umană, însă amestecată cu gel de aluminiu. După 8 zile de la ultima injecție, animalele au fost sîngerate total, după ce în prealabil s-a controlat titrul antiserurilor.

Formarea complexului imun radioactiv. Serurile de iepure antialbumină s-au amestecat și s-au utilizat ca atare sau numai fracțiunea lor globulinică, obținută prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ 40%. Peste antiser sau peste fracțiunea globulinică s-a adăugat albumină radioactivă, într-o cantitate determinată în prealabil pe o probă alicotă, suficientă pentru a precipita toți anticorpii din soluție. Precipitatul s-a lăsat peste noapte la rece, apoi s-a spălat cu NaCl 0,145 M rece de 10 ori, pînă cînd supernatantul n-a mai fost radioactiv.

Hidroliza complexului imun radioactiv. Precipitatul imun radioactiv s-a dizolvat în tampon glicocol—HCl, 0,1 M, pH 3,5, pînă la o concentrație proteică de aproximativ 2%. În alte experiențe, precipitatul imun s-a dizolvat în soluție de NaCl 0,145 M, adusă la pH 3,0 cu HCl. Peste probă s-a adăugat pepsină în proporție de 1 mg pepsină/100 mg complex imun. Amestecul a fost incubat timp de 6 ore la 37°C, după care s-a mai adăugat

încă o dată aceeași cantitate de pepsină și s-a continuat hidroliza încă 18 ore. Hidrolizatul a fost neutralizat pînă la pH 8,0 cu o soluție de NaOH 1 N, apoi s-a gel-filtrat pe o coloană de Sephadex G-150 (76/1,8 cm). Eluția s-a făcut în tampon fosfat, 0,2 M, pH 8. Viteza de curgere a fost de 24 ml/oră. Au fost recoltate probe de cîte 2 ml, care s-au măsurat spectrofotometric (la 280 nm) și radiometric cu un contor de scintilație cu puț.[1]

Scindarea fragmentului Fab' radioactiv. Preparatul ce conține fragmentul Fab' (aprox. 200 mg) s-a dizolvat în 4 ml tampon Tris-HCl, 0,55 M, pH 8. Peste această soluție s-a adăugat 0,5 ml tioglicolat de sodiu 0,5 M. S-a ținut amestecul o oră la temperatura camerei, apoi s-a răcit la gheață și s-au adăugat 4,5 ml soluție de iodacetamidă 0,5 M. S-a menținut amestecul încă o oră la gheață și s-a dializat față de o soluție de acid acetic N ce conținea uree 6 M.

În unele cazuri, reducerea fragmentului Fab' radioactiv s-a făcut în prezență de uree 6 M.

Separarea fragmentelor prin gel-filtrare. Soluția de Fab' radioactivă redusă a fost cromatografiată pe o coloană de Sephadex G-100 de 64/2 cm, echilibrată și eluată cu acid acetic N — uree 6 M. S-au măsurat densitatea optică și radioactivitatea fracțiunilor colectate. S-au separat net trei piscuri, care au fost contopite, dializate față de apă distilată, concentrate prin perevaporare și liofilizate.

Analiza imunoelectroforetică. S-a folosit gelul de agaroză 1 % în tampon veronal de pH 8,6, $\mu = 0{,}05$ (în cuvă) și 0,016 (în plăci). Timpul de migrare a fost de 2 ore, la un potențial de 6 V/cm. După spălare și uscare plăcile au fost puse în contact cu un film pentru raze X (Fluorapid Agfa), timp de 3 săptămîni, după care s-a developat filmul și s-a confruntat cu plăcile colorate cu Amidoschwarz. S-au folosit următoarele seruri imune: ser de porc anti-IgG de iepure, ser de porc antilanț H de iepure, ser de iepure antiserumalbumină umană, ser de porumbel antilanț H de iepure, antilanț L de iepure și antifragment Fd de iepure. Aceste seruri au fost preparate de dr. N. Chișiu de la Spitalul „Dr. I. Cantacuzino", folosind antigene puse la dispoziție de noi.

Analiza electroforetică. S-a folosit gelul de amidon cu uree 6 M, preparat în condițiile descrise de Poulik [11].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Gel-filtrarea hidrolizatului peptic pe Sephadex G-150 permite separarea a trei componenți (fig. 1).

În piscul I s-a identificat fragmentul F $(ab')_2$, piscul II conține fragmentul Fab', iar în piscul III se găsesc peptidele radioactive rezultate din degradarea albuminei serice și neradioactive rezultate din degradarea fragmentului Fc al anticorpilor. Componentele cuprinse în acest ultim pisc nu reacționează cu serul antialbumină și cu serurile anti-IgG și anti-H, dovadă că ele nu mai păstrează determinanții antigenici ai moleculelor inițiale.

[1] Măsurătorile au fost efectuate sub controlul lui V. Stănculescu de la Institutul de igienă căruia îi mulțumim și pe această cale.

Analiza imunoelectroforetică și radioimunoelectroforetică a hidrolizatului peptic, înainte și după separarea lui pe Sephadex G-150, este prezentată în figura 2.

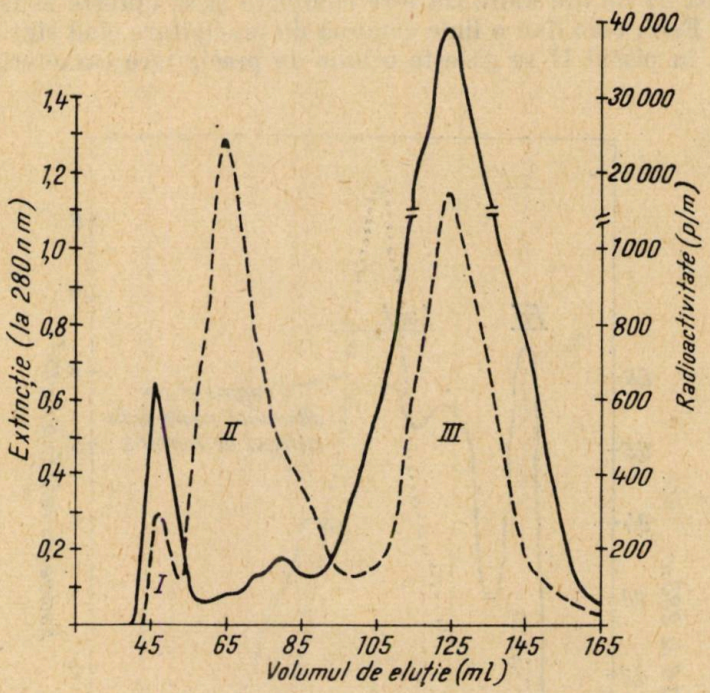


Fig. 1. — Gel-filtrarea hidrolizatului peptic pe Sephadex G-150.
——— Radioactivitate;
– – – proteină.

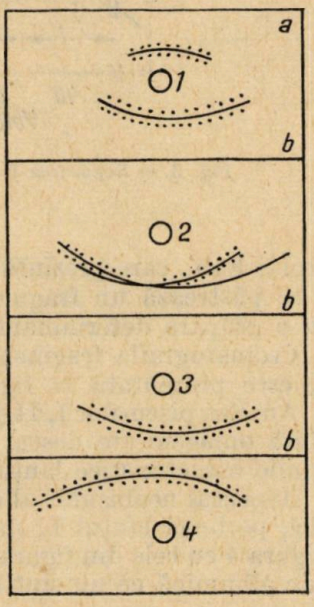


Fig. 2. — Analiza imunoelectroforetică și radioimunoelectroforetică a hidrolizatului peptic. *1* — Complex imun dizolvat în tampon glicocol-HCl, pH 3,5; *2* — complex imun hidrolizat 6 ore cu pepsină; *3* — complex imun hidrolizat 24 de ore cu pepsină; *4* — piscul II din cromatograma din figura 1; *a* — ser antialbumină umană; *b* — ser anti-IgG de iepure; arc de precipitare radioactiv.

Se observă că după o hidroliză de 6 ore motivul antigenic al albuminei este complet distrus, în timp ce din fragmentul Fc al anticorpilor se mai păstrează un component care reacționează cu serul imun folosit.

După 24 de ore hidroliza este completă și se oprește la fragmentele $F(ab')_2$ și Fab', care dau o linie comună de precipitare cînd sînt împreună. În sfîrșit, în piscul II se găsește o linie de precipitare caracteristică frag-

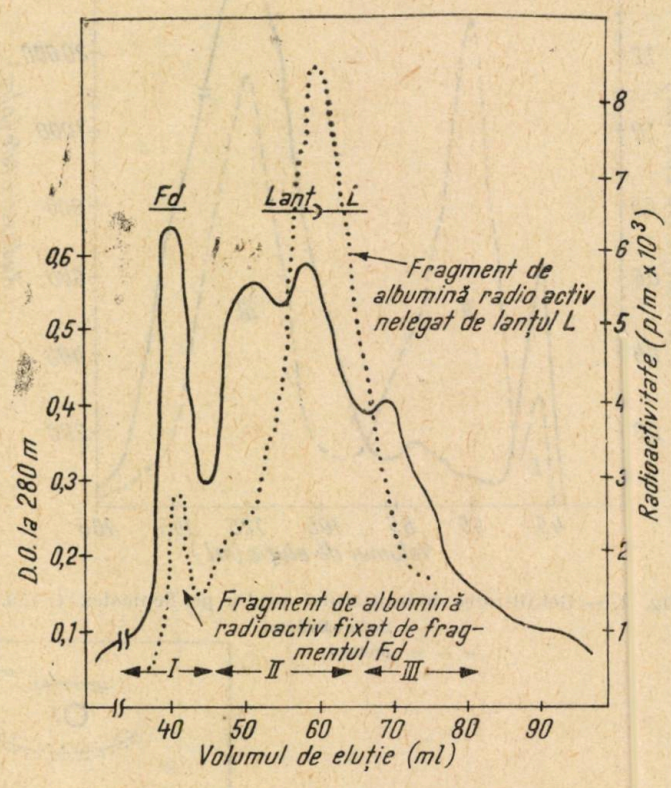


Fig. 3. — Separarea fragmentului Fd de lanțul L prin gel-filtrare pe Sephadex G-100.

mentului Fab', care prezintă radioactivitate, semn că în situsul de combinare se păstrează un fragment de albumină radioactivă care poartă cel puțin o grupare determinantă din cele ale moleculei inițiale.

Cromatografia fragmentului Fab' radiactiv, redus în prezența ureei 6 M, este prezentată în figura 3.

Analiza piscurilor I, II și III pe gel de amidon cu uree arată că piscul I prezintă omogenitate destul de mare, în timp ce piscurile II și III dau imaginile caracteristice lanțurilor L ușoare (fig. 4).

Aspectul neobișnuit al diagramelor electroforetice din piscul II arată că aici, pe lîngă lanțul L, mai există și alte proteine. Confruntînd datele din figura 4 cu cele din figura 3, rezultă că în piscul II se găsesc și fragmentele de albumină ce nu sînt legate în situsul de combinare.

Analiza imunoelectroforetică a celor trei piscuri are următorul aspect (fig. 5).

Se observă că radioactivitatea găsită în cromatograma din figura 3 pe lanțul L nu reprezintă, de fapt, o radioactivitate legată de lanțul L, deoarece la radioimunoelectroforeză linia de precipitare pentru L nu este radioactivă. În schimb, linia de precipitare dată de piscul I cu serul anti-Fd

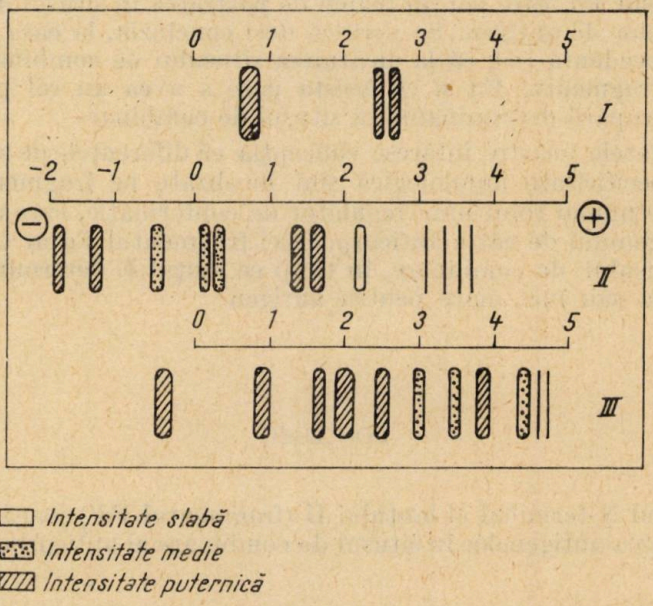


Fig. 4. — Electroforeza în gel de amidon cu uree 6 M a fracțiunilor cromatografice I, II și III obținute în figura 3.

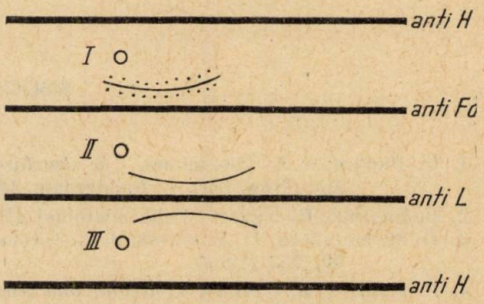


Fig. 5. — Imunoelectroforeza și radioimunoelectroforeza fragmentelor I, II și III obținute prin gel-filtrarea fragmentului Fab′ alchilat și redus pe Sephadex G-100. I, II, III — piscurile cromatografice din figura 3.

este radioactivă, arătînd că aici este prezent fragmentul Fd′ și că el reține o cantitate de radioactivitate. Calculînd din cromatograme cantitatea de radioactivitate care rămîne atașată ferm de Fd′, se găsește că aproximativ 10 % din radioactivitatea totală a amestecului supus reducerii rămîne atașată de fragmentul Fd′. Deoarece reducerea și separarea s-au efectuat în mediu de uree 6 M, s-ar părea că impurificarea Fd′ cu L nu este posibilă. Fortele care leagă fragmentul de antigen de Fd′ par a fi remarcabil de

puternice, din moment ce ele nu pot fi rupte într-un mediu de uree 6 M. De altfel, Metzger și Singer [12] au arătat că anticorpii anti-DNP sînt capabili să lege atît de puternic haptena, încît aceasta nu este eliberată nici prin reducerea și alchilarea moleculei, și separarea lanțurilor prin cromatografie pe Sephadex G-100, cu acid acetic N.

Rezultatele noastre sînt în concordanță cu recuperările de 7—9% arătate de Roholt și colab. [13] pentru activitatea remanentă de anticorpi a fragmentelor Fd, care pot da seama de păstrarea în situsul de combinare a fragmentelor de antigen. Se verifică deci concluzia, la care am ajuns în lucrarea precedentă [6], că la alcătuirea situsului de combinare participă nemijlocit fragmentul Fd și că acesta pare a avea un rol preponderent în fixarea grupării determinante în situsul de combinare.

Rezultatele noastre întăresc concepția că diferențele de secvență care imprimă specificitate imunologică sînt localizate pe fragmentul Fd, iar lanțul L are numai rolul unui regulator de conformație, care asigură tăria legării antigenului de către anticorp. Deci fragmentul Fd ar conferi specificitate situsului de combinare, în timp ce lanțul L determină afinitatea sa mai mică sau mai mare pentru antigen.

CONCLUZIE

Capătul N-terminal al lanțului H (fragmentul Fd') joacă un rol principal la fixarea antigenelor în situsul de combinare al anticorpului.

Prezentat la redacție la 29 decembrie 1969

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. D. Pressman, A. Grossberg, *The structure basis of antibody specificity*, W. A. Benjamin Inc., New York — Amsterdam, 1968, p. 201.
2. F. Franek, R. Nezlin, Folia microbiol. (Praga), **8**, 128 (1963).
3. G. M. Edelman, D. E. Olins, J. A. Gally, N. B. Zinder, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), **50**, 753 (1963).
4. F. Karush, S. Utsumi, *Molecular and cellular basis of antibody formation*, Proceedings of a Symposium, Prague, 1—5 iunie 1964, p. 145.
5. V. Gheție, *Progrese recente în disciplinele imunologice*, Edit. medicală, București, 1969.
6. L. Buzilă, V. Gheție, Rev. roum. Biochim., **6**, 183 (1969).
7. J. Cebra, D. Givol, J. biol. Chem., **236**, 1720 (1961).
8. J. Cebra, J. biol. Chem., **237**, 751 (1962).
9. D. Gitlin, E. Merler, Nature, **190**, 634 (1961).
10. P. Stelos, D. Pressman, J. biol. Chem., **237**, 3679 (1962).
11. M. D. Poulik, Biochim. biophys. Acta, **44**, 390 (1960).
12. H. Metzger, S. Singer, Science, **142**, 674 (1963).
13. O. Roholt, G. Radzimski, D. Pressman, J. exp. Med., **123**, 921 (1966).

MAINTENANCE OF ANTIGEN FRAGMENTS IN THE COMBINING SITES OF ANTIBODY SUBUNITS RESULTING FROM DIGESTION AND REDUCTION OF IMMUNE COMPLEXES

SUMMARY

Human serum albumin (^{131}I) — rabbit anti-human serum albumin immune complex was digested with pepsin and the Fab′ fragments were separated by gel-filtration on Sephadex G-150. The Fab′ fragment presents radioactivity thus showing that a radioactive fragment of human serum albumin was kept in the combining sites.

Fd′ fragment and L chain were separated by gel-filtration on Sephadex G-100 of the reduced and alkylated Fab′ fragment, in presence of 6 M urea. Radio-immunoelectrophoretic analysis shows radioactivity only on Fd′ precipitin line. Ten per cent of total radioactivity is bound by Fd′ fragment.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 275 – 279 (1970)

INFLUENȚA VIRUSURILOR MOZAICULUI CONOPIDEI ȘI MOZAICULUI CASTRAVEȚILOR ASUPRA ACTIVITĂȚII RIBONUCLEAZEI ÎN ANUMITE PLANTE-TEST

ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — Plantele de castraveți, conopidă, muștar și varză infectate cu virusurile mozaicului conopidei (VMC) și mozaicului castraveților (VMC') sînt caracterizate prin modificări ale activității ribonucleazei începînd cu prima zi de la inoculare. Analizele s-au efectuat în cinci momente ale perioadei de incubație, și anume la 1, 2, 3, 7 și 15 zile de la inoculare pentru castraveți și muștar și, respectiv, la 1, 2, 3, 11 și 23 de zile pentru conopidă și varză, reprezentînd începutul, mijlocul și sfîrșitul perioadei de incubație. Activitatea ribonucleazei este crescută în plantele-gazdă, indiferent de virusul cu care s-a făcut inocularea. Excepție fac plantele de castraveți și muștar infectate cu virusul mozaicului castraveților la două zile de la inoculare, cînd activitatea ribonucleazei este scăzută, și plantele de castraveți, conopidă și varză la 3 și, respectiv, 11 zile de la inoculare, cînd valorile sînt egale. Rezultatele sînt discutate din punctul de vedere al raportului parazit — plantă-gazdă.

Activitatea ribonucleazei poate servi, după cum se știe, ca indice al interacțiunii dintre virus și planta-gazdă.

Datele din literatură se referă numai la modificările induse în activitatea ribonucleazei de către un virus pe o gazdă, urmărind, pe lîngă efectul infecțiunii virale, și influența unor factori mecanici, fizici și fiziologici. Reddi [1], Frisch-Niggemayer și Reddi [2], Santilli, Nepokroeff și Gogliardi [3] au urmărit modificarea activității ribonucleazei în frunzele de *N. tabacum* L. (var. *Samsun*) și *Phaseolus vulgaris* L. (soiul Pinto) infectate cu virusul mozaicului tutunului și au constatat intensificarea activității enzimatice. Bagi și Farkas [4], Diener [5], [6], Santilli [7], Shinde, Chandrasekhar și Santilli [8], pe lîngă intensificarea activității ribonucleazei ca urmare a infecțiunii virale, au constatat și o intensificare a ei sub influența factorilor fiziologici, fizici și mecanici. Au lucrat cu plante de *N. tabacum* L. (var. *white Burley*), *Datura stramonium* L. și *Phaseolus vulgaris* L. (soiul Pinto) infectate cu virusul mozaicului tutunului și de *Phaseolus vulgaris* L. (soiul Pinto) infectate cu „pod mottle virus".

Virusul mozaicului conopidei este limitat numai la plante din fam. *Cruciferae* [9], [10], în timp ce virusul mozaicului castraveților infectează un număr mare de plante dicotiledonate și monocotiledonate.

În cercetările efectuate în vederea lămuririi raporturilor care se stabilesc între virusuri și gazdele lor, ne-am propus să efectuăm un studiu

comparativ asupra activităţii ribonucleazei sub influenţa a două virusuri pe aceleaşi gazde, precum şi a unui singur virus pe mai multe gazde.

În lucrarea de faţă prezentăm date în legătură cu modificarea activităţii ribonucleazei în plantele de castraveţi, conopidă, muştar şi varză, infectate experimental cu virusurile mozaicului conopidei şi mozaicului castraveţilor.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe plante de *Cucumis sativus* L. (soiul De Arad), *Brassica oleracea* L. (soiul Licurişca), *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. (soiul Erfurt timpuriu) şi *Sinapis alba* L.

Experienţele s-au efectuat în cursul perioadei de incubaţie, pe plante crescute în seră, în condiţii de temperatură 18—22°C, lumină 15 ore pe zi, intensitate 6 000—8 000 lucşi, umiditatea relativă a aerului 75—80%.

Inoculările s-au făcut pe cale mecanică, prin frecarea frunzelor cu suc provenit de la plante bolnave. Plantele de conopidă, muştar şi varză s-au inoculat în stadiul de două frunze, iar cele de castraveţi în stadiul de cotiledoane, adică în momentul optim de infecţiune. Ca martor s-au folosit plante tratate identic cu suc provenit de la plante sănătoase.

Probele s-au luat la 1, 2, 3, 7 şi 17 zile de la inoculare la castraveţi şi muştar şi, respectiv, la 1, 2, 3, 11 şi 23 de zile la conopidă şi varză, reprezentînd începutul, mijlocul şi sfîrşitul perioadei de incubaţie. Probe identice s-au recoltat la aceleaşi date de la plante sănătoase. În aceste probe s-a determinat activitatea ribonucleazei.

Analizele s-au efectuat pe probe medii de la 20 de plante, recoltîndu-se de la fiecare plantă cîte o frunză de la acelaşi etaj şi folosindu-se pentru fiecare determinare 4 g frunze.

Extracţia s-a făcut prin mojararea frunzelor la rece, în tampon citrat 0,1 M, la pH 5 [2]. În prealabil s-a determinat pH-ul optim de extracţie. Activitatea ribonucleazei s-a determinat în prezenţa ARN-ului ca substrat. S-a lucrat cu ARN pur, obţinut de la Fluka A. G. Chemische Fabrik Buchs S.G.L. Elveţia, purificat în prealabil prin dializă, în concentraţie de 0,1%, în tampon citrat 0,1 M. Probele s-au incubat timp de 30 de minute la 38°C, adică la temperatura optimă de activitate a enzimei. Inactivarea s-a făcut cu reactivul etanol-acid acetic-hidroxid de sodiu, la rece [11]. Martorul folosit s-a tratat identic, însă s-a inactivat de la început.

Soluţiile obţinute au fost clarificate prin centrifugare la 2 000—3 000 rot/min şi examinate la spectrofotometrul VSU_1, în ultraviolet, la 260 μm. Etalonarea s-a făcut cu acid 3'-adenilic. Activitatea ribonucleazei s-a exprimat în mg acid adenilic la 100 g substanţă uscată. Rezultatele sînt date în valori ale raportului bolnav/sănătos.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 se arată modificările produse în activitatea ribonucleazei la plantele de castraveţi, conopidă, muştar şi varză sub influenţa virusurilor mozaicului conopidei şi mozaicului castraveţilor.

Tabela 1

Modificarea activităţii ribonucleazei sub influenţa virusurilor mozaicului conopidei şi mozaicului castraveţilor

Virusul	Tipul de gazdă	Planta-gazdă	Etape de lucru zile	B/S
VMC	planta-gazdă tipică naturală	conopidă	1	1,6
			2	1,4
			3	1,2
			11	1,7
			23	2,5
	celelalte plante-gazdă	muştar	1	1,3
			2	1,5
			3	1,1
			7	1,3
			15	3,6
		varză	1	1,7
			2	2,4
			3	1,7
			11	1,6
			23	1,5
VMC′	planta-gazdă tipică naturală	castraveţi	1	2,3
			2	0,7
			3	1,0
			7	1,1
			15	1,3
	celelalte plante-gazdă	conopidă	1	1,1
			2	2,3
			3	1,0
			11	1,3
			23	2,2
		muştar	1	1,9
			2	0,6
			3	1,0
			7	1,1
			15	1,7
		varză	1	1,8
			2	1,7
			3	1,3
			11	1,0
			23	1,6

B/S = raportul dintre plantele bolnave şi cele sănătoase.

În cazul ambelor virusuri, între plantele bolnave şi cele sănătoase apar deosebiri în ceea ce priveşte activitatea ribonucleazei.

La plantele infectate cu virusul mozaicului conopidei, activitatea ribonucleazei apare stimulată atît la planta-gazdă tipică naturală, adică la conopidă, cît şi la celelalte plante-gazdă, adică la muştar şi varză, în toate momentele perioadei de incubaţie la care s-au efectuat determinările. În timp ce la conopidă şi muştar intensitatea maximă a activităţii ribonucleazei se atinge în momentul apariţiei simptomelor, la varză însă activitatea maximă se găseşte la două zile de la inoculare.

La plantele infectate cu virusul mozaicului castraveților, activitatea ribonucleazei apare stimulată, inhibată sau nemodificată atît în cazul plantei-gazdă tipice naturale, adică la castraveți, cît și la celelalte plante-gazdă, adică la conopidă, muștar și varză, în toate momentele perioadei de incubație la care s-au efectuat determinările. În timp ce la castraveți și muștar, adică la plantele cu o perioadă de incubație mai mică (15 zile), găsim o inhibare a activității enzimatice la două zile de la inoculare, la conopidă și varză, adică la plantele cu o perioadă de incubație mai lungă (23 de zile), nu se înregistrează această inhibare a activității enzimatice. La castraveți, conopidă și muștar în ziua a 3-a de la inoculare nu se înregistrează nici o modificare a activității ribonucleazei, la varză însă aceasta corespunde cu ziua a 11-a. Stimularea activității ribonucleazei se înregistrează la plantele de castraveți, conopidă și muștar la începutul, mijlocul și sfîrșitul perioadei de incubație, în timp ce la varză numai la începutul și sfîrșitul acesteia. Intensitatea maximă a activității ribonucleazei se găsește în toate cazurile la începutul perioadei de incubație (respectiv în prima sau a doua zi de la inoculare).

Reiese că modificările cele mai importante au loc în plantele infectate cu virusul care are un cerc mai larg de plante-gazdă, adică în cazul virusului mozaicului castraveților. Modificări mai importante se produc în plantele cu o perioadă scurtă de incubație a virusului.

Reacția unor gazde în anumite momente ale perioadei de incubație fiind diferită, exprimată prin valori mai mici sau mai mari ale stimulării activității ribonucleazei în cazul prezenței unui virus pe mai multe gazde, precum și prin scăderea, stimularea sau nemodificarea acesteia în cazul prezenței a două virusuri pe aceleași gazde, ne permite să afirmăm că în aceste cazuri aportul gazdei este preponderent. Acest punct de vedere este acceptat de Allen [12], Kuć [13] și alții.

Modificările care apar în activitatea ribonucleazei la plantele infectate cu cele două virusuri arată că în interrelația virus-gazdă există o acțiune preponderentă a gazdei.

CONCLUZII

1. Ambele virusuri, indiferent de gazda lor, induc modificări semnificative ale activității ribonucleazei, exprimate în general prin stimularea acesteia. La unele gazde însă se constată și o inhibare a activității enzimatice.

2. Există o specificitate a reacției de răspuns la infecțiunea virală a unor gazde, ceea ce indică un aport deosebit al gazdei în interrelația gazdă-parazit.

Prezentat la redacție la 27 martie 1970

Laboratorul de analize biochimice, radiometrice și electronice, Institutul de biologie „Tr. Săvulescu"

BIBLIOGRAFIE

1. K. K. Reddi, Biochim. biophys. Acta, **33**, 164 (1959).
2. W. Frisch-Niggemayer, K. K. Reddi, Biochim. biophys. Acta, **26**, 40 (1957).
3. V. Santilli, C. M. Nepokroeff, N. C. Gogliardi, Nature, **193**, 656 (1962).
4. G. Bagi, G. L. Farkas, Phytochemistry, **6**, 161 (1967).
5. T. O. Diener, Virology, **14**, 177 (1961).
6. T. O. Diener, Virology, **16**, 140 (1962).
7. V. Santilli, Symp. „Host-Parasite Relations in Plant Pathology", Publications of the Research Institute for Plant Protection, Budapest, 1964.
8. B. G. Shinde, B. K. Chandrasekhar, V. Santilli, Phitopathology, **54**, 908 (1964).
9. L. Broadbent, *Investigation of virus diseases of Brassica crops*, Univ. Press, Cambridge, 1957.
10. T. P. Pirone, S. G. Pound, J. R. Shepherd, Nature, **186**, 656 (1966).
11. R. Schucher, L. E. Hokin, J. biol. Chem., **210**, 551 (1954).
12. J. P. Allen, Phytopathology, **56**, 255 (1966).
13. J. Kuć, Ann. Rev. Microbiol., **20**, 337 (1966).

THE INFLUENCE OF CAULIFLOWER MOSAIC AND CUCUMBER MOSAIC VIRUSES ON THE RIBONUCLEASE ACTIVITY IN CERTAIN TEST PLANTS

SUMMARY

Cucumber (*Cucumis sativus* L., Arad variety), cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L., Early Erfurt variety), mustard (*Sinapis alba* L.,) and cabbage (*Brassica oleracea* L., Licurişca variety) plants infected with cauliflower mosaic (CIMV) and cucumber mosaic (CMV) viruses are characterised by the modification of ribonuclease (RN-ase) activity in the first day after inoculation. Analyses were carried out at five moments of the incubation period namely after 1, 2, 3, 7 and 15 days from the inoculation of cucumbers and mustard, and after 1, 2, 3, 11 and 23 days respectively of cauliflower and cabbage, representing the beginning, the middle and the end of the inoculation period.

The RN-ase activity is increased in host plants, whatever the inoculated virus is. Are excepted the cucumber and mustard plants infected with CMV, 2 days after inoculation, when RN-ase activity is low, and cucumber, cauliflower and mustard plants, after 3 days, when values are equal.

The results are discussed in the light of parasite-host plant relationships.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 281 – 284 (1970)

ELIBERAREA PROTEINELOR DIN BIOSTRUCTURA UNOR FRUNZE ŞI FRUCTE PRIN ÎNCĂLZIRE LA TEMPERATURI DIFERITE

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. – Determinarea cantităţii de suc ce se obţine prin stoarcerea frunzelor de porumb şi varză albă şi a fructelor de mere şi pere, preîncălzite la temperaturi diferite, precum şi a conţinutului său de proteine a arătat că de la 60°C în sus atît cantitatea de suc, cît şi aceea de proteine depăşesc cu mult pe acelea ce se obţin din materialul biologic nesupus preîncălzirii. Acest rezultat este interpretat în sensul că de la 60°C în sus biostructura frunzelor şi fructelor cercetate se destramă, punînd în libertate, concomitent, atît apa, cît şi proteinele.

Într-o lucrare precedentă [1] am arătat că din frunzele de varză albă şi varză roşie, preîncălzite timp de o oră la 60, 80 şi 100°C, se obţine prin stoarcere la 300 atm o cantitate mult mai mare de suc decît din frunzele neîncălzite (probe martor) sau preîncălzite la 40°C. Pe de altă parte, în sucul stors din frunzele de varză şi porumb preîncălzite la temperaturi de la 60°C în sus activitatea peroxidazei este mult mai intensă decît în sucurile stoarse din frunzele martor sau preîncălzite la 40°C [2]. Am dedus că surplusul menţionat al cantităţii de suc şi al activităţii peroxidazei se datoreşte destrămării biostructurii, care se produce începînd de la 60°C în sus.

Date fiind importanţa biologică a proteinelor şi probabilitatea ca cel puţin o parte a proteinelor celulare să fie integrată în biostructură, era necesar de stabilit:

– dacă într-adevăr biostructura conţine componente proteice;

– dacă destrămarea biostructurii, provocată de temperaturi ridicate, duce la eliberarea proteinelor;

– dacă proteinele se eliberează din biostructură concomitent cu apa.

Pentru aceasta era necesar să măsurăm cantităţile de suc care se obţin din ţesuturile vegetale preîncălzite la temperaturi diferite, să determinăm concentraţia proteinelor din sucuri şi să comparăm rezultatele obţinute.

MATERIAL ŞI METODĂ DE LUCRU

Cercetările le-am efectuat pe frunze de porumb (*Zea mays*, hibrid 409) în vîrstă de 20—25 de zile, crescute în condiţii de laborator, pe frunze de varză (*Brassica oleraceea* L. var. *capitata*, D.C.F. *alba*), detaşate de pe căpăţîni, pe fructe de măr şi păr, în felul următor :

Din frunzele de porumb şi varză se cîntăreau cîte 5 probe de cîte 50 g. Probele martor (A) se ţineau la temperatura camerei (20—22°C) şi se storceau ca atare. Celelalte 4 probe (B) se introduceau pe rînd în borcane cu dop rodat şi se cufundau într-o baie marină, care se încălzea la temperaturi diferite (40, 60, 80 şi 100°C) timp de o oră, apoi se răceau la temperatura camerei şi se storceau. Astfel se obţinea, în funcţie de împrejurări, fie numai sucul vacuolar, dacă frunzele rămîneau vii, fie sucul mixt, dacă frunzele erau omorîte. Stoarcerea probelor se efectua cu o presă hidraulică manuală de laborator, tip Hafico, model 2 litri. Presiunea se ridica progresiv pînă la 150 atm şi se menţinea la limită pînă cînd materialul înceta să mai dea suc.

Fructele se tăiau fiecare în cîte 5 segmente şi se cîntăreau cîte 5 probe de cîte 100 g, apoi se proceda ca mai sus.

După măsurarea volumului, sucurile se centrifugau timp de 20 de minute la 3 000 rot/min pentru sedimentarea eventualelor particule suspendate, se diluau cu apă distilată în proporţie de 1 : 40, iar într-o parte alicotă a sucurilor astfel diluate se determinau substanţele proteice după metoda Lowry [3].

REZULTATE

Unele dintre rezultatele cercetărilor efectuate pe frunzele de porumb şi varză albă sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Cantitatea de suc, concentraţia lui în proteine şi cantitatea acestor substanţe cuprinsă în sucul stors din frunze de porumb şi varză albă prin comprimare la 150 atm, fără preîncălzire şi după preîncălzire timp de o oră la 40, 60, 80 şi 100°C

Temp. °C	Frunze de porumb			Frunze de varză albă		
	suc ml	proteine mg/100 ml	proteine mg	suc ml	proteine mg/100 ml	proteine mg
21	16	180	28,8	7	68,0	4,7
22	12	132	15,8	5	68,0	3,4
40	13	196	26,4	10	64,0	6,4
40	18	188	33,8	8	68,0	5,4
60	28	310	86,9	26	108,0	28,0
60	25	252	63,0	29	180,0	52,2
80	34	308	104,0	32	143,0	44,8
80	31	304	94,0	28	168,0	47,0
100	26	308	80,0	33	208,0	68,6
100	32	356	113,9	32	200,0	64,0

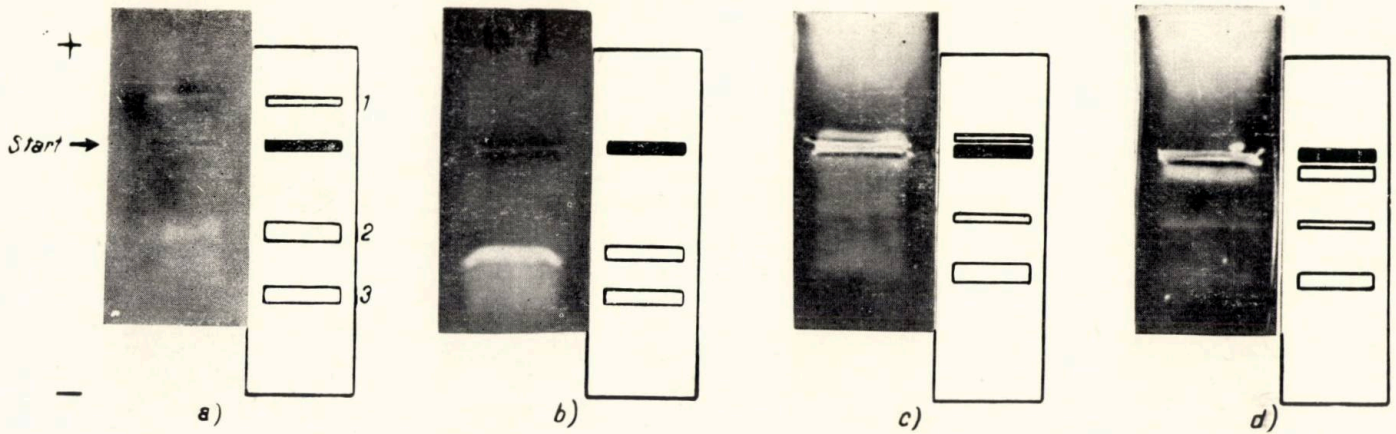


Fig. 1. — Spectrul electroforetic al enzimelor amilolitice din secară :

a — extract proteic din făina totală din semințe negerminate; *b* — extract proteic din coleoptil, rădăcini sau restul seminței după 2 sau 5 zile de germinare; *c* — extract proteic din frunze; *d* — suc vacuolar din frunze.

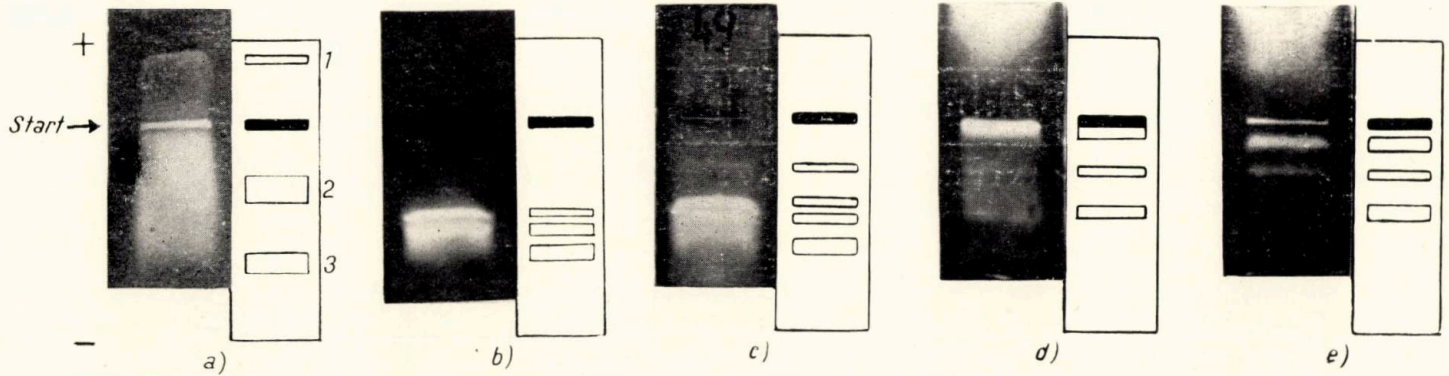


Fig. 2. — Spectrul electroforetic al enzimelor amilolitice din orz :

a — extract proteic din făina totală din semințe negerminate; *b* — extract proteic din coleoptil, rădăcini sau restul seminței după 3 zile de germinare, din rădăcini sau restul seminței după 5 zile de germinare; *c* — extract proteic din coleoptil de 5 zile; *d* — extact proteic din frunze; *e* — suc vacuolar din frunze.

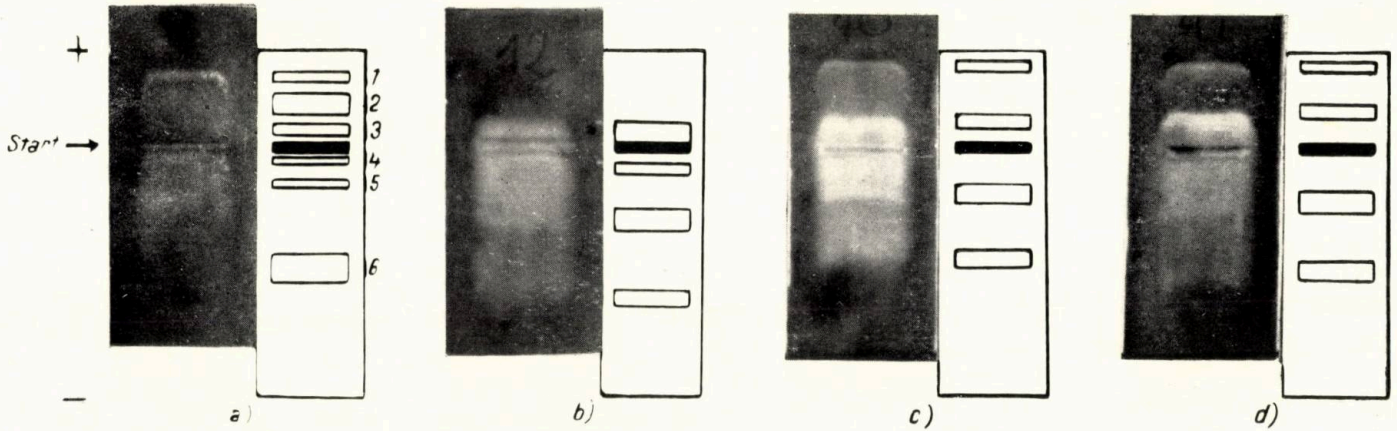


Fig. 3. — Spectrul electroforetic al enzimelor amilolitice din ovăz:
a — extract proteic din făina totală din seminţe negerminate; *b* — extract proteic din coleoptil, rădăcini sau restul seminţei după 2 sau 5 zile de germinare; *c* — extract proteic din frunze; *d* — suc vacuolar din frunze.

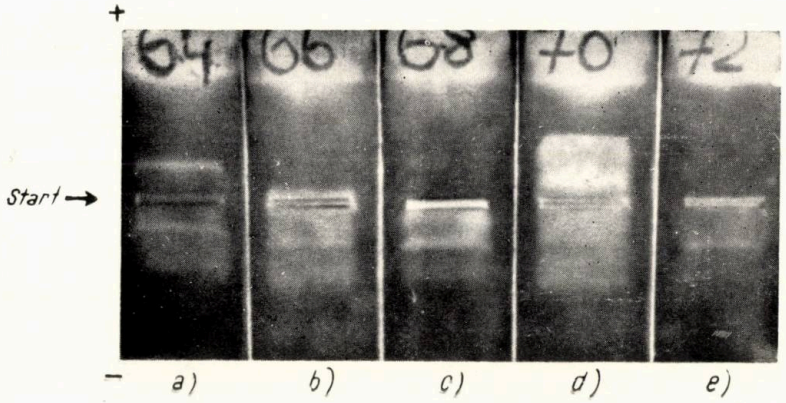


Fig. 4. — Spectrul electroforetic al enzimelor amilolitice din frunzele unor cereale:
a — porumb; *b* — grîu; *c* — orz; *d* — ovăz; *e* — secară.

Se constată că, în cazul preîncălzirii frunzelor la temperatura de 40°C, cantitatea de suc și concentrația lui în proteine corespund acelora ale sucului obținut din frunzele martor păstrate la temperatura de 20—22°C. În schimb, începînd de la 60°C în sus, cantitatea sucului ce se stoarce din frunzele preîncălzite și concentrația în proteine devin mult mai mari decît în cazurile precedente. Important este că efectul preîncălzirii la temperaturi peste 40°C este aproximativ același, indiferent dacă s-a lucrat la 60, 80 sau 100°C.

Rezultate similare s-au obținut și la mere și pere (tabela 2).

Tabela 2

Cantitatea de suc, concentrația lui în proteine și cantitatea acestor substanțe cuprinsă în sucul stors din fructe de măr și păr prin comprimare la 150 atm, fără preîncălzire și după preîncălzire timp de o oră la 40, 60, 80 și 100°C

Temp. °C	Suc de mere			Suc de pere		
	Suc ml	proteine mg/100 ml	proteine mg	suc ml	proteine mg/100 ml	proteine mg
23	33	188,0	62,0	23	88,0	20,2
26	30	216,0	64,8	28	112,0	31,1
40	57	112,0	63,0	33	76,0	25,0
40	35	144,0	50,4	35	80,0	28,0
60	50	232,0	116,0	58	88,0	51,0
60	47	228,0	107,1	52	120,0	62,4
80	54	196,0	105,8	52	100,0	52,0
80	53	288,0	152,6	51	112,0	57,1
100	42	408,0	171,3	46	156,0	71,7
100	53	252,0	133,5	54	140,0	75,6

CONCLUZII

Interpretarea acestor rezultate în lumina concepției biostructurale duce la următoarele concluzii:

— În frunzele și fructele cercetate, cantitatea de proteine integrate în biostructură este cu mult mai mare decît cea aflată în lichidul intracelular.

— Preîncălzirea frunzelor și fructelor la temperaturi de la 60°C în sus determină destrămarea biostructurii lor și eliberarea proteinelor integrate în ea.

— Eliberarea din biostructură a proteinelor are loc concomitent cu eliberarea apei care fusese integrată în ea.

— Pînă la temperaturi de 40°C inclusiv, biostructura frunzelor și fructelor cercetate rămîne intactă.

Prezentat la redacție la 27 aprilie 1970

Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie,
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
2. A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **13**, 151 (1970).
3. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).

THE RELEASE OF PROTEINS FROM THE BIOSTRUCTURE OF SOME LEAVES AND FRUITS BY HEATING AT DIFFERENT TEMPERATURES

SUMMARY

The amount of sap obtained by squeezing maize and cabbage leaves, or apple and pear fruits, previously heated at different temperatures, as well as sap protein content, is much higher above 60°C than that obtained from non-heated biological material. These results suggest that above 60°C the biostructure of leaves and fruits breaks down, thus concomitantly releasing both water and proteins.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 285 – 289 (1970)

STUDIUL ELECTROFORETIC AL AMILAZELOR SECAREI, ORZULUI ŞI OVĂZULUI ÎN PRIMELE ETAPE DE CREŞTERE

FLORIN MIHĂILESCU

Rezumat. — S-a efectuat separarea electroforetică în gel de agar cu adaos de amidon a fracţiunilor α-amilazice din seminţe negerminate, din seminţe germinate şi din frunze de secară, orz şi ovăz. Aceste materiale conţin α-amilază în stare activă, sub forma a 2—6 fracţiuni. Frunzele dau acelaşi spectru electroforetic, indiferent de starea lor (normale sau etiolate) şi de provenienţa preparatului proteic (suc vacuolar sau extract). Cele trei specii cercetate conţin o fracţiune α-amilazică asemănătoare ca mobilitate cu α-amilaza salivară umană, la secară şi orz în toată perioada cercetată, iar la ovăz abia după 2 zile de germinare. β-Amilaza se găseşte în toate preparatele cercetate, mai ales la seminţele negerminate, iar în timpul germinării restrînsă la o zonă slab electronegativă. Seminţele negerminate prezintă aceeaşi enzimogramă ; după germinare, spectrul este specific speciei. Aceste rezultate sînt apoi discutate şi comparate cu cele de la porumb şi grîu din lucrări anterioare.

În lucrări anterioare s-a urmărit la porumb (*Zea mays*) [1] şi grîu (*Triticum aestivum*) [2] evoluţia izoenzimelor α- şi β-amilazice în primele 8—9 zile de germinare, precum şi în primele frunze ale plantei. Cercetările au arătat că cele două specii de *Gramineae* conţin β-amilază sub o singură formă moleculară, cu aceeaşi mobilitate electroforetică. Enzimele de tip α-amilazic se găsesc în stare activă atît în sămînţa negerminată, cît şi după germinare, precum şi în primele frunze, sub diferite forme moleculare. Cele două specii diferă foarte mult prin formele moleculare evidenţiate în aceleaşi etape de creştere.

Acest fapt ne-a determinat să luăm în studiu şi alte specii din familia *Gramineae*, şi anume secara (*Secale cereale*), orzul (*Hordeum vulgare*) şi ovăzul (*Avena sativa*).

În literatura cercetată nu am găsit date asupra formelor moleculare ale amilazelor din secară şi ovăz, ci doar lucrări cu privire la formele moleculare ale amilazelor din scutelul plus endospermul seminţei de orz după germinare [3], [4].

MATERIALE ŞI METODE

S-a lucrat pe secară Petkus obţinută de la I.C.A.—Bucureşti, pe orz şi ovăz obţinute de la Laboratorul pentru controlul seminţelor — judeţul Ilfov.

Modul de lucru pentru obținerea materialului din semințele negerminate, după germinare și din primele frunze a fost relatat anterior [1], [2]. S-a lucrat cu coleoptil, rădăcini și restul seminței (scutel plus endosperm), după 2 și 5 zile de germinare, cu excepția orzului, cînd s-a lucrat și după 8 zile de germinare. Frunzele normale și etiolate au fost recoltate între 10 și 14 zile de la semănare, adică 7—11 zile de la răsărire.

Extractele proteice brute s-au obținut folosind ca extractant o soluție de clorură de sodiu 9‰, în aceleași proporții ca și la grîu [2] și porumb [1]. În cazul extractelor în care activitatea amilolitică era slabă, de exemplu la semințele negerminate și la extractul și sucul vacuolar din frunzele de secară etiolate, preparatele proteice brute au fost dializate peste noapte față de apă distilată, la rece, și apoi s-au liofilizat. Extractele obținute în timpul germinării au fost diluate corespunzător cu apă distilată. Preparatele proteice din frunze au fost folosite ca atare, nediluate.

Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,25% (Special Agar Noble-Difco, Michigan) cu 0,5% amidon pentru electroforeză (Connaught-Toronto), în tampon de acid succinic-hidroxid de sodiu cu adaos de fosfat disodic, în condițiile descrise anterior [1], [2].

Modul de developare a enzimogramelor a fost relatat în aceleași lucrări [1], [2].

REZULTATE

Se știe că în gelul de agar apare în timpul electroforezei fenomenul de electroendosmoză, care, prin curentul pe care-l produce, deplasează fracțiunile spre catod. Față de limita de migrare a amidonului în condițiile noastre (4,3 cm), toate fracțiunile puse în evidență în această lucrare sînt electronegative.

Enzimogramele obținute cu preparate proteice din semințele de *secară* (fig. 1*a*) evidențiază trei benzi incolore sau roz pentru enzimele de tip α-amilazic. Dintre ele, una migrează spre anod, iar celelalte două spre catod. După 2 și 5 zile de germinare (fig. 1*b*) s-a constatat că coleoptilul, rădăcina și restul seminței prezintă același spectru pentru enzimele de tip α-amilazic, și anume numai cele două fracțiuni dinspre catod de la sămînța negerminată.

Extractele proteice din frunzele de secară (fig. 1*c*), ca și sucul lor vacuolar (fig. 1*d*), dau după electroforeză enzimograme care prezintă trei benzi incolore, toate migrînd spre catod. Se constată că diferența dintre coleoptil și frunza verde constă în apariția unei fracțiuni de tip α-amilazic spre catod, lîngă start. Pentru a vedea dacă existența acestei noi fracțiuni este specifică frunzei ca organ sau dacă este datorată fotosintezei, am examinat și formele moleculare α-amilazice prezente în frunzele etiolate. Am constatat că frunzele etiolate prezintă aceeași enzimogramă ca și frunzele verzi, dovedind că fracțiunea sus-menționată este specifică de organ. Trebuie să subliniem că la frunzele etiolate activitățile enzimatice ale tuturor fracțiunilor sînt mai mici decît în frunzele normale.

La *orz*, sămînța negerminată (fig. 2*a*), prezintă aceleași trei forme moleculare α-amilazice ca și sămînța de secară. Coleoptilul, rădăcina și restul seminței, după 3 zile de germinare, conțin trei forme moleculare

de tip α-amilazic, care migrează toate spre catod (fig. 2*b*). Spectrul electroforetic arată că după germinare regăsim fracțiunile α-amilazice 2 și 3 dinspre catod ale seminței și, în plus, o a 3-a fracțiune, situată între ele (apropiată de fracțiunea dinspre start). După 5 zile de germinare constatăm același aspect pentru rădăcină și restul seminței (fig. 2*b*). La coleoptilul de 5 zile (fig. 2*c*) se pune în evidență încă o fracțiune de tip α-amilazic, mai electronegativă decît celelalte.

Frunzele de orz (fig. 2*d*) prezintă trei forme moleculare de tip α-amilazic, aspectul general al enzimogramei fiind asemănător celui obținut la frunzele de secară.

Aceste date ne-au pus problema dacă nu cumva fracțiunea mai electronegativă din coleoptilul de 5 zile și-ar mări treptat mobilitatea prin creșterea sarcinii sale electronegative globale și ar deveni, la frunză, fracțiunea de lîngă start. Pentru aceasta, am analizat și coleoptilul după 8 zile de germinare, cînd frunza era destul de bine formată. Am constatat însă că mobilitatea electroforetică a acestei fracțiuni este identică cu cea a coleoptilului după 5 zile de germinare, ceea ce ne conduce la ideea că transformarea are loc în momentul apariției frunzei ca organ.

Sucul vacuolar al frunzei normale de orz (fig. 2*e*) conține tot trei fracțiuni de tip α-amilazic. Formele moleculare prezente în frunzele etiolate s-au urmărit și în cazul orzului. Atît extractul, cît și sucul din frunzele etiolate dau enzimograme asemănătoare cu ale frunzelor normale, dar fracțiunile sînt mai slabe.

Semințele negerminate de *ovăz* (fig. 3*a*) evidențiază șase fracțiuni de tip α-amilazic, și anume trei fracțiuni spre anod și trei spre catod. După 2 și 5 zile de germinare, coleoptilul, rădăcina și restul seminței prezintă patru fracțiuni de tip α-amilazic, dintre care una migrează spre anod, rămînînd lîngă start, iar celelalte spre catod (fig. 3*b*).

Extractul proteic brut din frunzele de ovăz (fig. 3*c*) relevă patru fracțiuni de tip α-amilazic, din care două migrează spre anod și două spre catod. Același spectru îl prezintă și sucul lor vacuolar (fig. 3*d*). Frunzele etiolate dau enzimograme asemănătoare celor normale, dar activitatea fracțiunilor este mai mică.

În ceea ce privește β-amilaza, constatăm că ea este foarte activă în preparatele proteice din semințele negerminate de secară, orz și ovăz. În acest stadiu, ea este răspîndită pe toată zona ce cuprinde fracțiunile de tip α-amilazic.

După germinare, la secară și orz β-amilaza se restrînge la zona cuprinsă între fracțiunile de tip α-amilazic 2 și 3 ale semințelor negerminate, iar la ovăz ea ocupă o zonă mai largă, și anume între fracțiunile 4 și 6 ale semințelor negerminate.

La frunze, β-amilaza este răspîndită la secară și orz în zona care cuprinde cele trei fracțiuni α-amilazice, iar la ovăz între fracțiunile 2 și 4 de tip α-amilazic.

DISCUȚII

Examinarea comparativă, prin aceeași tehnică, a cinci specii aparținînd familiei *Gramineae: Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, prezentate în această lucrare, și *Triticum aestivum* [2] și *Zea mays* [1],

ne-a arătat că la fiecare din aceste specii formele moleculare de tip α-amilazic au o evoluţie specifică. Grîul [2], secara şi orzul prezintă acelaşi aspect al enzimogramelor în etapa de sămînţă negerminată. O dată cu începerea germinării se produce o diferenţiere netă a formelor moleculare de tip α-amilazic, în funcţie de specie. Porumbul [1] şi ovăzul prezintă enzimograme specifice, diferite între ele şi faţă de primele trei specii, în sensul că porumbul prezintă în special fracţiuni slab electronegative, pe cînd ovăzul conţine şi fracţiuni puternic electronegative.

Germinarea duce la apariţia de forme de tip α-amilazic slab electronegative la grîu [2], orz şi secară, mai electronegative la porumb [1] şi ovăz.

Frunzele celor cinci specii cercetate (fig. 4) prezintă spre catod două fracţiuni cu aceeaşi mobilitate electroforetică. Diferenţa dintre ele constă în sarcina electrică globală a fracţiunilor mai electronegative. Astfel, ovăzul prezintă două fracţiuni migrate spre anod, porumbul [1] o fracţiune spre anod, iar grîul [2], secara şi orzul o fracţiune în regiunea startului, cu mici deosebiri în funcţie de specie.

Constatăm că fracţiunea cea mai electronegativă din sucul vacuolar al frunzelor de secară, orz şi ovăz are aceeaşi comportare ca şi la porumb [1] şi grîu [2], în sensul că sarcina electrică globală a acestei fracţiuni este mai mică la sucul vacuolar al frunzei decît în extractul proteic brut.

Precizăm că fracţiunile de tip α-amilazic, care ar trebui să apară ca benzi incolore pe fondul albastru al gelului, se prezintă ca benzi roz în cazul cînd preparatul conţine β-amilază foarte activă. Culoarea roz dispare uneori după o incubare prelungită, aceste fracţiuni devenind incolore.

Frydenberg şi Nielsen [3], lucrînd pe 98 de soiuri de orz, prin electroforeză în gel de agar cu tampon de fosfaţi, pH 7,3, au găsit că scutelul plus endospermul de orz germinat au dat maximum 9 zone individuale cu activitate de tip α- şi β-amilazic. Autorii menţionează că toate aceste benzi s-au întîlnit rar pe aceeaşi enzimogramă, în cadrul celor 98 de soiuri. Dintre cele 9 benzi, maximum 5 reprezintă fracţiuni de tip α-amilazic, rezultat obţinut şi de Momotami şi Kato [4]. În condiţiile noastre de lucru am găsit trei fracţiuni de tip α-amilazic. După cum s-a arătat în cadrul prezentării amilazelor din porumb [1], formele moleculare α-amilazice evidenţiate în tamponul de fosfaţi şi în tamponul de acid succinic-hidroxid de sodiu cu adaos de fosfat disodic sînt aceleaşi. Acest fapt ne conduce la presupunerea că diferenţa de număr de benzi α-amilazice se datoreşte unor deosebiri genetice între soiurile cercetate.

Am arătat că la grîu [2] există în primele etape de creştere o fracţiune de tip α-amilazic a cărei sarcină electrică globală este asemănătoare cu cea a α-amilazei salivare umane. În cadrul speciilor cercetate în prezenta lucrare, această fracţiune se găseşte la orz şi secară în toate etapele de creştere investigate, iar la ovăz am putut-o evidenţia şi în frunze doar după 2 zile de germinare. Nu este exclus ca ea să existe şi în sămînţa de ovăz negerminată, dar sub limita de sensibilitate a metodei noastre.

CONCLUZII

1. α-Amilaza se găseşte în stare activă în seminţele de secară, orz şi ovăz negerminate şi după germinare, precum şi în frunze, sub forma a 2—6 fracţiuni, în funcţie de specie şi etapa de creştere.

2. α-Amilazele din frunze sînt prezente sub aceleaşi forme moleculare atît în sucul vacuolar, cît şi în citoplasma frunzei normale şi etiolate.

3. În frunzele normale, activitatea α-amilazică este mai mare decît în frunzele etiolate.

4. Secara şi orzul prezintă aceeaşi enzimogramă în stadiul de sămînţă negerminată, dar evoluţia ulterioară a izo-α-amilazelor este specifică speciei.

5. Una din fracţiunile α-amilazice prezentă în secară şi orz în toată perioada cercetată este asemănătoare, ca mobilitate, cu α-amilaza din saliva umană; această fracţiune s-a pus în evidenţă şi la ovăz, însă după germinare.

6. β-Amilaza este prezentă în special în preparatele din seminţele negerminate şi din frunze. În timpul germinării, β-amilaza se evidenţiază numai sub forma unei benzi slab electronegative.

Autorul mulţumeşte dr. Victoria Alexandrescu pentru îndrumările şi ajutorul preţios acordat în realizarea acestei lucrări.

Prezentat la redacţie la 28 aprilie 1970

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Victoria Alexandrescu, F. Mihăilescu, St. cerc. biochim., **12**, 315 (1969).
2. Victoria Alexandrescu, F. Mihăilescu, Rev. roum. Biochim., **7**, 3 (1970).
3. O. Frydenberg, G. Nielsen, Hereditas, **54**, 123 (1965).
4. Y. Momotami, J. Kato, Plant Cell Physiol., **8**, 439 (1967).

ELECTROPHORETIC STUDY OF RYE, BARLEY AND OAT AMYLASES DURING THE FIRST GROWING STAGES

SUMMARY

The electrophoretic separation of α-amylase fractions in both non-germinated and germinated seeds as well as in rye, barley and oat leaves, was performed in agar gel with added starch. These materials contain active α-amylase as 2—6 fractions. The leaves exhibit the same electrophoretic pattern irrespective of their state (normal or etiolate) or the source of protein preparation (vacuolar sap or extract). The three investigated species contain an α-amylase fraction similar in mobility to human salivary α-amylase: in rye and barley throughout the investigated period, and in oat only after 2 days of germination. β-Amylase occurs in all the preparations investigated, particularly in non-germinated seeds, while during germination it is restricted to a slight electronegative zone. The non-germinated seeds exhibit the same zymogram; after germination the pattern is species characteristic.

These results are discussed and compared with those obtained for maize and wheat, and presented in previous papers.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 291 – 299 (1970)

TEORIA BIOSTRUCTURII ŞI PROBLEMA APEI ŞI IONILOR DE CLOR ÎN AXONII GIGANŢI DE *SEPIA*

FLORENTINA MOSORA

Rezumat. — S-au reexaminat de pe poziţiile teoriei biostructurii rezultatele obţinute de către Steinbach în 1941 în lucrarea *Clorul în axonii giganţi de Sepia.* Admiţîndu-se că majoritatea apei citoplasmei vii este integrată în biostructură şi nu are însuşiri de solvent, rezultă că ionii de clor sînt dizolvaţi doar în apa liberă celulară, concentraţia lor fiind egală cu aceea din mediul exterior datorită permeabilităţii membranei celulare pentru aceşti ioni. În lumina acestor consideraţii s-a ajuns la următoarele concluzii : rezultatele experimentale obţinute de Steinbach cu privire la concentraţia ionilor de clor în axonii giganţi de *Sepia* capătă, în lumina teoriei biostructurii, o interpretare cu totul diferită de aceea pe care le-o dă teoria membranei ; spre deosebire de teoria membranei, teoria biostructurii permite explicarea atît a mecanismului, cît şi a cauzelor care determină deplasarea şi distribuţia ionilor de clor între axon şi mediul exterior, în cazul unor soluţii de îmbăiere diferite.

Problema repartiţiei ionilor de clor între celulele vii şi lichidul interstiţial a fost cercetată pînă acum mai mult de pe poziţiile teoriei membranei, după care toată apa citoplasmei ar fi liberă şi ar cuprinde în ea întreaga cantitate a ionilor de clor intracelulari. Or, dozînd clorul din citoplasma diferitelor celule şi raportînd cantitatea lui la toată apa citoplasmei, se obţin pentru „concentraţiile" ionilor de clor intracelulari valori cu mult mai mici decît ale concentraţiei clorului din mediul extern. Aşa, de exemplu, după Steinbach [21], „concentraţia" ionilor de clor în axonul viu de *Sepia* este de numai 36 mM/1000 g axoplasmă, adică de 15 ori mai mică decît cea din apa de mare sau din sîngele *Sepiei* [8], [22], [23], unde concentraţia clorului este de 540 mM/l (Robertson [20] indică pentru sîngele *Sepiei* cifra de 560 mM/l). Paradoxal este că diferenţa de „concentraţie" se menţine în tot timpul vieţii celulelor, deşi s-a demonstrat că membranele celulelor vii sînt permeabile pentru ionii de clor [1], [3], [9], ([18], p. 149, 19).

Pentru a explica acest paradox, adepţii teoriei membranei admit că în celulele vii „concentraţia" scăzută a ionilor de clor se menţine fie prin intervenţia echilibrului Donnan [3], [6] sau a gradientului electrochimic

[1] Concentraţiile calculate după teoria membranei le vom închide între ghilimele.

[1], [2], fie datorită unei „pompe de clor" [10], [21], mecanism care ar fi localizat în membranele celulare şi care, consumînd energie metabolică, ar expulza ionii de clor ce pătrund în celule datorită „gradientului de concentraţie" dintre acestea şi mediul extern.

Cu totul altfel se prezintă problema repartiţiei ionilor de clor între celulele vii şi mediul extern dacă este examinată de pe poziţiile teoriei biostructurii, elaborată de Macovschi [16]. Conform acestei teorii, numai o mică parte a apei citoplasmei e liberă şi conţine ioni (apa liberă), deoarece majoritatea apei citoplasmei celulelor vii nu are însuşiri de solvent, fiind, pe de o parte, integrată într-o structură cu totul specială, numită biostructură (apa biostructurală sau apa asimilată), iar pe de altă parte fiind legată de coloizi (apa legată) [16], [12]. Prin urmare, concentraţia ionilor de clor în celulele vii trebuie calculată raportînd cantitatea lor numai la apa cu adevărat liberă, şi nu la toată apa citoplasmei, cum se procedează în lumina teoriei membranei.

Mai mult, ţinînd seama de faptul că membranele celulelor vii sînt permeabile pentru ioni, teoria biostructurii admite egalitatea concentraţiilor în apa liberă a citoplasmei şi în apa mediului extracelular. Aceasta înseamnă că nu există nici ipoteticul „gradient de concentraţie" al ionilor de clor, de o parte şi de alta a membranei celulare, admis de teoria membranei, şi nici ipotetica „pompă de clor", care, conform aceleiaşi teorii, ar asigura permanenţa acestui gradient.

Concluziile de mai sus impun reexaminarea de pe poziţia teoriei biostructurii a rezultatelor diferitelor cercetări efectuate pînă acum în problema clorului celular; pentru început am ales lucrarea publicată de Steinbach [21].

Pentru a urmări variaţia „concentraţiei" clorului din axonii giganţi de *Sepia*, în urma imersării acestora în apă de mare, în soluţii lipsite de clor (sau cu puţin clor) şi în alcool absolut, Steinbach a folosit următorul procedeu experimental:

„În cele mai multe cazuri, axonii au fost cu grijă eliberaţi de ţesutul conjunctiv şi de fibrele nervoase mici, apoi au fost imersaţi în soluţiile dorite. În cîteva cazuri, în care se cerea o viteză mare de lucru, nervii au fost îndepărtaţi rapid şi doar un capăt de axon era curăţit de materialul extern" ([21], p. 58).

„Axonii (sau nervii întregi cu un capăt de axon liber) au fost apoi scoşi din soluţie şi uscaţi cu grijă pe hîrtie de filtru. Apoi au fost plasaţi astfel încît cea mai mare parte a lungimii lor să se afle pe hîrtia de filtru, cu un capăt proaspăt tăiat şi liber al axonului pe o bucată de sticlă parafinată şi cîntărită în prealabil la o microbalanţă. Axoplasma a fost scoasă rostogolind peste hîrtia de filtru un scurt cilindru de sticlă, pe toată lungimea axonului. Rostogolirea a fost oprită înainte de a se ajunge la porţiunea de axon de pe bucata de sticlă. Axoplasma scoasă în felul acesta semăna cu o piftie de culoare deschisă. Fiecare bucată de sticlă cu proba de axoplasmă era apoi cîntărită, cît mai repede posibil, pe o microbalanţă, iar clorul era determinat prin tehnica Wigglesworth" ([21], p. 58).

Cantitatea de clor astfel găsită era raportată la 100 g axoplamă. În cele ce urmează, noi vom exprima însă această „concentraţie" în mM/1000 g axoplasmă.

Înainte de a trece la reexaminarea lucrării citate este necesar să aducem unele precizări cu privire la concentraţia ionilor de clor din axoplasmă. Steinbach a arătat că, „după aproximativ o oră de tratare cu apă de mare (incluzînd timpul necesar pentru disecţie), clorul din axoplasmă se ridică la un nivel mai înalt decît cel iniţial şi se menţine constant pentru perioade lungi de timp" ([21], p. 58). Valorile respective ale „concentraţiei"

Tabela 1

„Concentraţia" ionilor de clor şi cantitatea apei libere din axonii giganţi de *Sepia*, ţinuţi perioade de timp diferite în apa de mare (coloanele 1, 2, 3, 4 după Steinbach [21], coloana 5 după teoria biostructurii)

1	2	3	4	5
Nr. exp.	Axon	Timp de imersare în apa de mare	Clor (mM/1000 g axoplasmă)	Apă liberă (ml/1000 g axoplasmă)
1a	stîng proximal	30 min	52	96
b	stîng distal	30 min	55	102
c	drept proximal	30 min	58	107
d	drept distal	30 min	57	105,55
2a	stîng	35 min	83	154
b	drept	35 min	94	174
3a	stîng	5,5 ore	75	139
b	drept	5,5 ore	61	113
4a	drept proximal	8 ore	68	126
b	drept distal	8 ore	74	137
5a	stîng	5 min	43	80
b	drept	30 min	59	109
6a	stîng	5 min	46	85
b	drept	60 min	98	181
7a	stîng distal	18 min	21	39
b	stîng proximal	70 min	49	91
8a	drept distal	8 min	19	35
b	drept proximal	45 min	52	96
c	stîng distal	20 min	29	54
d	stîng proximal	80 min	78	144
9a	stîng	5 min	40	74
b	drept	3,5 ore	99	183
10a	drept	5 min	56	104
b	stîng	3,5 ore	93	172

iniţiale şi ulterioare a ionilor de clor din axoplasmă sînt reproduse şi în unele cărţi de specialitate ([18], p. 149). Exprimate în mM/1000 g axoplasmă, ele sînt: 36 mM/1000 g axoplasmă pentru „concentraţia" iniţială şi 75 mM/1000 g axoplasmă pentru cea ulterioară. Examinînd însă tabela 1, în care rezultatele analitice obţinute de Steinbach sînt reproduse în noul nostru mod de exprimare, se poate observa că ambele valori de mai sus se încadrează, de fapt, între limitele tuturor celorlalte valori ale „concentraţiei" din această tabelă, obţinute la diverşi timpi de imersare a axonului în apa de mare şi a căror medie generală, exprimată sub forma $m \pm 2\ s_m$ (unde s_m = abaterea standard a mediei), este de 61 ± 9,2 mM/1000 g axoplasmă. Impresia unei creşteri a „concentraţiei" ionilor de clor de la valoarea „iniţială" de 36 mM/1000 g axoplasmă pînă la valoarea „finală", aproape dublă, de 75 mM/1000 g axoplasmă, în decursul unei ore de imersare a axonilor în apa de mare, s-ar putea datora unei simple dispersii

întîmplătoare a rezultatelor experimentale, și nu unei variații reale, în timp, a „concentrației" ionilor de clor în axoplasma vie. De altfel, după Keynes, „chiar în materialul cel mai proaspăt conținutul de clor era de peste 100 mM/kg greutate umedă, valoarea medie totală și eroarea standard pentru 17 probe fiind de 108 ± 2 mM/kg" ([10], p. 703). Deosebirile dintre valori se datoresc faptului că cei doi autori au lucrat atît cu metode de analiză diferite, cît și pe specii diferite de animale [2].

Dacă analizele efectuate de Steinbach arată că ionii de clor se găsesc în axoplasma vie de *Sepia* în cantitate medie de 61 mM/1000 g axoplasmă, iar conform teoriei biostructurii concentrația clorului în axoplasmă, este egală cu aceea din apa de mare, adică cu 540 mM/l, înseamnă că cei 61 mM ioni de clor din 1000 g axoplasmă se găsesc dizolvați nu în toată apa pe care o conțin 1000 g axoplasmă, ci numai într-o parte a ei, care reprezintă apa liberă. Se calculează ușor că volumul acesteia din urmă este 113 ml. Restul este apă integrată în biostructură și apă legată, ambele lipsite de însușiri de solvent.

Este interesant de observat că, dacă rezultatele experimentale ale lui Steinbach și acelea ale lui Keynes se interpretează în lumina teoriei membranei, ar urma ca în primul caz „concentrația" ionilor de clor din axoplasmă să varieze, de la un axon la altul, între 19 și 150 [3] mM/1000 g axoplasmă, iar în al doilea între 89 și 122 mM/1000 g greutate umedă, așadar între limite relativ foarte depărtate. După teoria biostructurii însă, la toți axonii concentrația clorului în apa liberă a axoplasmei este aceeași și egală cu cea din apa de mare. Prin urmare, dacă un axon se deosebește de altul prin conținutul total de ioni de clor al axoplasmei, aceasta se explică prin faptul că axoplasma lor diferă totodată prin cantitățile de apă liberă pe care le conține și în care acești ioni se găsesc dizolvați, formînd soluții de aceeași concentrație. Aceste cantități de apă liberă le-am calculat pentru fiecare din axonii ce figurează în tabela 1, plecînd de la rezultatele analitice obținute de Steinbach (col. 4 din aceeași tabelă) și admițînd că ionii de clor formează cu apa liberă a axoplasmei soluții de concentrație egală cu aceea a apei de mare (540 mM/l). Ele sînt înscrise în ultima coloană a tabelei.

Dacă concentrația ionilor de clor în axoplasma vie este egală cu aceea din apa de mare, ar urma ca imersarea axonului în soluții lipsite de clor sau cu clor în concentrație mai mică decît în apa de mare să provoace ieșirea clorului din axon, iar reintroducerea lui în apă de mare să fie urmată de revenirea concentrației clorului la valoarea inițială. Or, datele obținute de Steinbach în cadrul unor asemenea cercetări permit verificarea valabilității previziunilor menționate, cu condiția ca pentru calcul să recurgem nu la „concentrațiile" stabilite de Steinbach (col. 6 din tabela 2), ci la cele deduse pe baza teoriei biostructurii (col. 8—9 din aceeași tabelă).

În acest scop, am admis că perechile de axoni simetrici folosiți în fiecare experiență în parte conțin aceeași cantitate de apă liberă, întrucît provin de la același animal. Am mai admis că în axonii reintroduși în apa

[2] Koechlin [11] și Deffner [5] au găsit pentru „concentrația" clorului din interiorul axonului gigant valori de 140, 150 și 151 mM/kg.

[3] Valoarea 150 mM/1000 g axoplasmă este dată în tabela 3, exp. 1, pentru axonul de control.

Tabela 2

Concentrația ionilor de clor, cantitatea apei libere și valoarea constantei K în axonii giganți de *Sepia* ținuți în diferite soluții și în axonii de control imersați în aceleași soluții plus o perioadă de revenire în apa de mare normală (coloanele 2, 3, 4, 5, 6 după Steinbach [21], coloanele 7, 8, 9, 10, 11 după teoria biostructurii)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nr. exp.	Axon	Soluție *	Timp de imersare în soluție ore	Timp de imersare în apa de mare ore	„Concentrația" clorului (mM/1000 g axoplasmă)	Apă liberă (ml/1000 g axoplasmă)	Concentrația clorului (mM/1000 ml apă liberă a axoplasmei)		Concentrația clorului în mediul extern (mM/l)	K (t = min)
							$A - x$	A	C_0	
1a	stîng	zaharoză	2,7	0	5	180	28	—	0	0,00793
b	drept	zaharoză	2,7	2	97	180	—	540	0	
2a	stîng	zaharoză	2	0	0	109	0	—	0	0,02277
b	drept	zaharoză	2	3	59	109	—	540	0	
3a	stîng	acetat de sodiu	2,75	0	36	144	250	—	0	0,00203
b	drept	acetat de sodiu	2,75	2	78	144	—	540	0	
4a	stîng	azotat de sodiu	2	0	15	124	121	—	0	0,00541
b	drept	azotat de sodiu	2	3	67	124	—	540	0	
5a	drept	NO_3SW **	1,5	0	36	211	171	—	86	0,00808
b	stîng	NO_3SW	1,5	1,5	114	211	—	540	86	
6a	stîng	NO_3SW	1,5	0	46	211	218	—	86	0,00596
b	drept	NO_3SW	1,5	1,5	114	211	—	540	86	

* Toate soluțiile au fost izotonice și tamponate la pH 7,8 — 8,2.

** NO_3SW este o apă de mare artificială (formula lui Allen) cu azotat de sodiu; concentrația clorului 86 mM/l.

de mare concentraţia clorului revine la normal, întrucît „concentraţiile" găsite de Steinbach se încadrează în limitele valorilor date în tabela 1[4]. Pornind de aici, am calculat cantitatea apei libere pentru fiecare axon martor (tabela 2, col. 7) şi apoi, cunoscînd această cantitate de apă, am calculat pentru axonii simetrici corespunzători, pe baza datelor menţionate de Steinbach (tabela 2, col. 6), concentraţia ionilor de clor rămaşi după imersarea în mediile lipsite de clor sau cu clor puţin. Valorile astfel obţinute, înscrise în tabela 2, col. 8, concordă cu prevederile noastre, întrucît:

— axonii imersaţi pentru 2,7 şi 2 ore într-o soluţie izotonică de zaharoză pierd aproape toţi ionii de clor, concentraţia acestor ioni scăzînd pînă la 28 şi chiar 0 mM/1000 ml apă liberă a axoplasmei (exp. 1a şi 2a);

— imersarea pentru 2,75 şi 2 ore în soluţii izotonice de electroliţi (acetat, respectiv azotat de sodiu) lipsite de clor duce de asemenea la ieşirea clorului din axon, însă concentraţiile scad numai pînă la valori de 250 şi, respectiv, 121 mM/1000 ml apă liberă a axoplasmei (exp. 3a şi 4a);

— ionii de clor ies din axon şi în cazul imersării acestuia în apă de mare artificială (formula lui Allen), cu un conţinut de ioni de clor de numai 86 mM/l, ajungînd în decurs de 1,5 ore la valorile de 171 şi 218 mM/1000 ml apă liberă a axoplasmei (exp. 5a şi 6a).

După teoria biostructurii, toate aceste scăderi ale concentraţiei ionilor de clor în apa liberă a axoplasmei reprezintă consecinţa efluxului acestor ioni din axon în mediul exterior respectiv, datorită gradientului de concentraţie dintre axoplasmă şi acest mediu. Ele se produc conform formulei de difuzie (1), aplicată de Macovschi [14] în cazul efluxului ionilor de sodiu din axonii giganţi de *Sepia* încărcaţi cu aceşti ioni [7]:

$$K = \frac{\log (A - C_0) - \log[(A - C_0) - x]}{t}. \qquad (1)$$

În formula (1), A reprezintă concentraţia iniţială a ionilor de clor din axon, egală cu cea din apa de mare: 540 mM/1000 ml apă liberă a axoplasmei (tabela 2, col. 9); C_0 reprezintă concentraţia ionilor de clor din mediul exterior (C_0 este 0 în cazul soluţiei de zaharoză, acetat şi azotat de sodiu şi egal cu 86 mM/l în cazul apei de mare artificiale) (tabela 2, col. 10); x reprezintă cantitatea ionilor de clor (exprimată sub forma unei concentraţii) ieşită din axon în cazul imersării acestuia în mediile menţionate, în decursul timpului t (durata imersării), exprimat în minute (tabela 2, col. 4), iar $K = \frac{k}{2{,}303}$, k reprezentînd ansamblul constantelor: $-D$, Q şi G din ecuaţia lui Fick ([14], p. 226).

Este evident că valorile constantei K (tabela 2, col. 11) variază de la o experienţă la alta, datorită atît condiţiilor diferite în care acestea au fost executate, cît şi intervenţiei posibile a diferiţilor factori de care pentru moment nu am ţinut seamă (de exemplu potenţialul de membrană,

[4] Valoarea de 114 mM/1000 g axoplasmă, din ultimul rînd al coloanei 6, deşi este mai mare decît valorile date în tabela 1, este totuşi mult mai mică decît valoarea găsită pentru un axon imersat doar în apa de mare (axon de control) în cazul experienţei 1 din tabela 3 (150 mM/1000 g axoplasmă).

modificări de permeabilitate). Dar, dacă luăm în considerare cele două experienţe efectuate în apă de mare artificială, constatăm că raportul dintre valoarea medie a constantei K (0,00702) şi valoarea aceleiaşi constante din ecuaţia similară corespunzătoare efluxului ionilor de sodiu din axonul gigant de *Sepia* (0,00461) ([14], p. 227) este de 1,52, valoare ce concordă cu raportul dintre mobilităţile ionilor de clor şi de sodiu (1,51)[5]. Această coincidenţă ni se pare semnificativă, deşi atît valorile constantei K, cît şi cele ale mobilităţii ionilor au fost determinate în condiţii diferite.

Menţionăm că prin interpretarea de pe poziţia teoriei membranei a rezultatelor obţinute de Steinbach nu s-a putut explica de ce în axonii imersaţi în soluţiile de azotat şi acetat de sodiu care nu conţin clor, „concentraţia" acestuia, deşi scade, rămîne totuşi în limitele normale (36 şi, respectiv, 15 mM/1000 g axoplasmă), încadrabile în valorile cuprinse în tabela 1 sau apropiate de aceste valori, în timp ce axonii imersaţi în soluţiile de zaharoză, de asemenea fără clor, pierd aproape tot clorul, „concentraţia" acestuia în axon devenind de 5 şi chiar 0 mM/1000 g axoplasmă. Nu s-a putut explica nici faptul că imersarea în apă de mare artificială de concentraţie de clor (86 mM/l) mai mare decît „concentraţia" normală medie din axoplasmă (75 mM/1000 g axoplasmă) este urmată totuşi de ieşirea clorului din axon şi de scăderea „concentraţiei" acestuia pînă la 36 şi, respectiv, 46 mM/1000 g axoplasmă.

În fine, putem lua în considerare rezultatele cercetărilor efectuate cu alcool absolut. Cufundînd axonii în alcool absolut pentru 60 s şi introducîndu-i apoi în apă de mare (tabela 3), s-a constatat că clorul pătrunde

Tabela 3

Ionii de clor din axonii giganţi de *Sepia*, ţinuţi 60 s în alcool absolut şi apoi imersaţi în apa de mare; axonii de control, imersaţi doar în apa de mare, provin de la aceleaşi animale (coloanele 1, 2, 4 după Steinbach [21], coloana 3, atît după Steinbach [21], cît şi după teoria biostructurii)

1	2	3	4
Nr. exp.	Timp de imersare în apa de mare min	Clorul în axonii ţinuţi în alcool absolut (mM/1000 g axoplasmă)	Clorul în axonii de control (mM/1000 g axoplasmă)
1	30	197	150
2	60	193	74
3	90	300	90

în aceşti axoni în cantitate cu mult mai mare decît în axonii martor şi s-a afirmat că aceasta se datorează omorîrii axonilor prin alcoolul absolut, întrucît numai în celulele vii „concentraţia" clorului (36 mM/1000 g axoplasmă) este scăzută faţă de aceea din mediul exterior (540 mM/l).

În lumina teoriei biostructurii se poate da însă următoarea explicaţie: alcoolul absolut, omorînd axonii, provoacă destrămarea biostructurii şi deci eliberarea apei asimilate. Datorită acestui fenomen, concen-

[5] Pentru mobilităţile ionilor de clor şi sodiu s-au luat valorile de 65,3 şi, respectiv, 43,3, obţinute la 18°C [4].

traţia clorului în apa liberă a axoplasmei scade şi astfel apare un gradient de concentraţie între axoplasmă şi mediul exterior, ceea ce face ca clorul să pătrundă în axon. Tot datorită acestui fenomen, „concentraţiile" constatate de Steinbach în axonii trataţi cu alcool reprezintă de data aceasta şi concentraţiile definite conform teoriei biostructurii (tabela 3, col. 3). Cum însă după 90 min concentraţia clorului în axon atinge doar valoarea de 300 mM/1000 g axoplasmă în loc de 540 mM/l, cît este în apa de mare, înseamnă că momentul egalizării concentraţiilor nu poate fi sesizat după valorile cuprinse în tabela 3 sau că între timp o parte a apei libere a ieşit din axonul omorît. De altfel, fenomenul destrămării biostructurii şi eliberării apei asimilate, fiind demonstrat experimental printr-o serie de lucrări efectuate de Macovschi şi colab. [13], [15], [17], vine în sprijinul explicaţiei menţionate.

CONCLUZII

1. Rezultatele experimentale obţinute de Steinbach [21] cu privire la concentraţia ionilor de clor în axonii giganţi de *Sepia* capătă, în lumina teoriei biostructurii, o interpretare cu totul diferită de aceea pe care le-o dă teoria membranei.

2. Deosebirile individuale în privinţa cantităţilor de clor cuprinse în axoni se datorează cantităţilor diferite de apă liberă din axoni.

3. Mecanismul care stă la baza trecerii ionilor de clor prin membrane, în cazul imersării axonilor în diferite medii, este un fenomen de difuzie care urmează legea lui Fick.

4. Creşterea cantităţii de clor în axonii imersaţi în alcool absolut se datorează destrămării biostructurii, provocată de agentul citat, şi deci eliberării cantităţii corespunzătoare de apă din această structură.

5. Spre deosebire de teoria membranei, teoria biostructurii permite deci să se explice atît mecanismul, cît şi cauzele care determină deplasarea şi distribuţia ionilor de clor între axon şi mediul exterior, în cazul unor soluţii de îmbăiere diferite.

Prezentat la redacţie la 25 martie 1970

Catedra de biochimie,
Facultatea de biologie,
Universitatea Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. R. H. Adrian, J. Physiol., **151**, 154 (1960).
2. R. H. Adrian, J. Physiol., **156**, 623 (1961).
3. P. J. Boyle, E. J. Conway, J. Physiol., **100**, 1 (1941).
4. R. Brdička, *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, 3 Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1962, 507.
5. G. G. J. Deffner, Biochim. biophys. Acta, **47**, 378 (1961).
6. A. L. Hodgkin, Biol. Rev., **26**, 339 (1951).
7. A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, J. Physiol., **128**, 28 (1955).
8. A. L. Hodgkin, Proc. roy. Soc. B, **148**, 1 (1957).
9. A. L. Hodgkin, P. Horowicz, J. Physiol., **148**, 127 (1959).

10. R. D. KEYNES, J. Physiol., **169**, 690 (1963).
11. B. A. KOȩCHLIN, J. biophys. biochem. Cytol., **1**, 511 (1955).
12. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **9**, 123 (1966).
13. E. MACOVSCHI, I. MARINEANU, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
14. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **11**, 213 (1968).
15. E. MACOVSCHI, A. MIHĂESCU, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
16. E. MACOVSCHI, *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969, 86.
17. E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
18. D. N. NASONOV, *Mestnaia reactzia protoplasmy i rasprostraneai iușceesea vozbujdenie*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscova—Leningrad, 1959.
19. J. P. REUBEN, L. GIRARDIER, H. GRUNDFEST, J. gen. Physiol., **47**, 1141 (1964).
20. J. D. ROBERTSON, J. exp. Biol., **26**, 182 (1949).
21. H. B. STEINBACH, J. cell. comp. Physiol., **17**, 57 (1941).
22. D. A. WEBB, J. exp. Biol., **116**, 178 (1939).
23. D. A. WEBB, Proc. roy. Soc. B, **129**, 107 (1940).

BIOSTRUCTURE THEORY AND THE PROBLEM OF THE WATER AND CHLORIDE IONS IN THE GIANT AXONS OF THE SQUID

SUMMARY

The results obtained by *Steinbach* in 1941, in his paper: „Chloride in the giant axons of the squid" were reconsidered by us in terms of the biostructure theory.

By admitting that the major part of the water in live cytoplasm is integrated in the biostructure and does not possess the capacities of a solvent, it follows that the chloride ions are dissolved in the free cell water only, their concentration being equal to that of the surrounding medium owing to cell membrane permeability to these ions. In the light of these considerations we reached the following conclusions:

— the experimental results obtained by *Steinbach* regarding the concentration of the chloride ions in the giant axon of the squid, acquire, when considered in the light of the biostructure theory, an interpretation wholly different from that given by the membrane theory;

— in contrast to the membrane theory, the biostructure theory permits to account for the mechanism as well as the causes determining the movement and the distribution of the chloride ions in the axon and the surrounding medium, in the case of various bathing solutions.

ST. CERC. BIOCHIM. 13, 3, 301 – 306 (1970)

CÎTEVA CONSIDERAȚII ASUPRA APLICĂRII METODEI OGUR-ROSEN LA DOZAREA ACIZILOR NUCLEICI DIN SUCURILE VACUOLAR ȘI PLASMATIC ALE FRUNZELOR DE PORUMB

CONSTANȚA MUȘOLAN

Rezumat. — S-a verificat posibilitatea aplicării metodei Ogur-Rosen la dozarea acizilor nucleici din sucurile vacuolar și plasmatic obținute din frunzele de porumb. S-a constatat că în tratarea preliminară a probelor analizate este suficientă cîte o singură operație de spălare în fiecare etapă. S-a arătat că $HClO_4$ 1 N, la +4°C, în timp de 18 ore hidrolizează doar parțial ARN și aproape de loc ADN. ARN este hidrolizat total la +40°C, în timp de 4 ore, pe cînd ADN nu. Așadar, condițiile optime de hidroliză cu $HClO_4$ 1 N par să fie temperatura de +40°C și timpul de 4 ore.

Metoda Ogur-Rosen [1] este una dintre metodele des folosite pentru dozarea acizilor nucleici. După cum se știe, ea se bazează pe hidroliza selectivă a acizilor nucleici cu acid percloric; se admite că acidul ribonucleic este hidrolizat cantitativ de către acidul percloric 1 N în timp de 18 ore la +4°C, iar acidul dezoxiribonucleic de către acidul percloric 0,5 N în timp de 20 min la +70°C. Estimarea acizilor nucleici în hidrolizatele respective se face spectrofotometric și uneori prin dozarea paralelă a fosforului sau a pentozelor. Aplicată inițial la dozarea acizilor nucleici în vîrfurile rădăcinilor și în polen [1], metoda Ogur-Rosen a fost extinsă și la alte țesuturi. Unii autori au evidențiat anumite limite de aplicabilitate a acestei metode, recomandînd, în funcție de materialul cercetat, diferite modificări [2]—[5].

Încercînd să dozăm prin metoda Ogur-Rosen acizii nucleici în sucurile vacuolar și plasmatic din frunzele de porumb, în scopul cercetării repartiției acestor substanțe între soluția intracelulară și biostructură și al distribuției lor în interiorul acesteia [6], am constatat că metoda Ogur-Rosen nu poate fi aplicată ca atare la materialul menționat. Această constatare ne-a determinat să facem o analiză mai atentă metodei, pentru a preciza condițiile în care ea poate fi folosită la dozarea acizilor nucleici în sucurile vegetale. Rezultatele obținute constituie obiectul lucrării de față.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am folosit frunze de porumb HS-301 în vîrstă de 10—14 zile. Sucurile vacuolare și fracțiunile succesive de suc plasmatic au fost obținute printr-o metodă descrisă anterior [7]. Sucurile s-au centrifugat la rece, la 5 500 rot/min, 20 min. Din supernatant s-a luat o probă alicotă de 10 ml și s-a tratat cu 25 ml $HClO_4$ 1 N, 30 min la rece, apoi s-a centrifugat. Precipitatul obținut s-a prelucrat în continuare conform metodei Ogur-Rosen, cu deosebirea că s-a efectuat cîte o singură operație de spălare la fiecare etapă, și nu două, așa cum recomandă autorii.

Pentru a urmări acțiunea temperaturii asupra hidrolizei acizilor nucleici am efectuat experiențe în care precipitatul spălat și uscat era întîi hidrolizat cu $HClO_4$ 1 N la temperaturile +4, +10, +20, +30, +40, +50, +60, +70°C, timp de 4 ore. Menționăm că perioada de 4 ore a fost aleasă după încercări preliminare, cînd ea s-a dovedit cea mai adecvată cercetării noastre. După centrifugare și spălare de două ori cu cîte 2 ml $HClO_4$ 1 N, supernatantul s-a reunit cu lichidele de spălare, iar volumul final reprezenta „hidrolizatul cu $HClO_4$ 1 N". Precipitatul rămas s-a hidrolizat în continuare cu $HClO_4$ 0,5 N la 70°C, 20 min. După centrifugare și spălare în modul descris mai sus, volumul final reprezenta „hidrolizatul cu $HClO_4$ 0,5 N". Acizii nucleici din cele două tipuri de hidrolizate s-au dozat spectrofotometric (spectrofotometrul VSU-2, d = 1 cm, λ = 260 mμ) și colorimetric (metoda Moule [8] pentru ARN și metoda Burton [9] pentru ADN). Rezultatele sînt exprimate în μg/ml suc de ARN, respectiv ADN. Curbele etalon au fost trasate folosind ARN din drojdie, respectiv ADN din timus de vițel.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 sînt date rezultatele cîtorva dozări spectrofotometrice și colorimetrice ale ARN și ADN în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N", respectiv

Tabela 1

Concentrațiile ARN și ADN (μg/ml) determinate în sucul vacuolar și fracțiunile succesive de suc plasmatic ale frunzelor de porumb după metoda Ogur-Rosen

Nr. exp.	ARN (hidrolizatul cu $HClO_4$ 1 N)			ADN (hidrolizatul cu $HClO_4$ 0,5 N)		
	suc vacuolar	fracțiunea plasmatică		suc vacuolar	fracțiunea plasmatică	
		I	II		I	II
	Dozare spectrofotometrică					
1	16	65	61	64	122	108
2	16	57	65	67	137	108
3	17	58	52	40	132	103
4	14	67	52	41	127	113
	Dozare colorimetrică					
1	17	60	47	8	75	60
2	17	59	45	6	75	61
3	17	54	45	9	75	68
4	16	66	46	8	80	56

„hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N", obţinute conform indicaţiilor metodei Ogur-Rosen. Se constată că datele obţinute pe cale spectrofotometrică indică prezenţa unei cantităţi mai mari de ADN decît de ARN în materialul analizat. Pe de altă parte, dozările colorimetrice arată că în realitate cantitatea de ADN este mult mai mică decît cea dozată spectrofotometric. Se pare deci că „hidrolizatul cu $HClO_4$ 0,5 N" obţinut în condiţiile recomandate de metoda Ogur-Rosen reprezintă nu numai cantitatea de ADN din proba analizată, ci şi o parte din cantitatea de ARN ce nu a fost hidrolizată în prima etapă. Menţionăm că Basler şi Commoner [3] au arătat de asemenea că prin metoda Ogur-Rosen ARN şi ADN nu se pot separa complet. Pentru a verifica această presupunere am dozat colorimetric ARN în cele două tipuri de hidrolizate.

Din tabela 2 se observă că în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N" concentraţia ARN este foarte mare, depăşind-o chiar pe cea din „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N". Această constatare confirmă presupunerea enunţată

Tabela 2

Concentraţia ARN (μg/ml) în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N" şi „hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N" obţinute după metoda Ogur-Rosen din sucurile vacuolare şi fracţiunile de suc plasmatic ale frunzelor de porumb (metoda Moule)

Nr. exp.	Hidrolizatul cu $HClO_4$ 1 N			Hidrolizatul cu $HClO_4$ 0,5 N		
	suc vacuolar	fracţiunea plasmatică		suc vacuolar	fracţiunea plasmatică	
		I	II		I	II
1	18	153	48	48	171	88
2	18	149	45	45	176	90
3	18	108	45	32	144	85

mai sus, şi anume că $HClO_4$ 1 N la +4°C în timp de 18 ore hidrolizează doar parţial ARN, restul fiind solubilizat împreună cu ADN de către $HClO_4$ 0,5 N la +70°C, 20 min. Acest fapt este consemnat şi de către Cassel [2], care, lucrînd pe *Bacillus cereus*, recomandă pentru hidroliză totală a ARN prelungirea timpului la 30 de ore.

În tabela 3 sînt date rezultatele unor experienţe de dozare colorimetrică a ADN în cele două tipuri de hidrolizate. Se constată că în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N" concentraţia ADN este foarte mică, uneori nulă,

Tabela 3

Concentraţia ADN (μg/ml) în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N" şi „hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N" obţinute după metoda Ogur-Rosen din sucurile vacuolare şi fracţiunile de suc plasmatic ale frunzelor de porumb (metoda Burton)

Nr. exp.	Hidrolizatul cu $HClO_4$ 1 N			Hidrolizatul cu $HClO_4$ 0,5 N		
	suc vacuolar	fracţiunea plasmatică		suc vacuolar	fracţiunea plasmatică	
		I	II		I	II
1	0	1	3	9	148	60
2	0	3	1	7	148	62
3	0	1	1	11	119	67

ceea ce arată că $HClO_4$ 1 N la +4°C timp de 18 ore nu hidrolizează ADN decît foarte slab. Unii autori, ca Loeb și Dickinson [4], lucrînd pe timus de șoarece, și Ogur [5], lucrînd pe drojdie, au semnalat însă în aceleași condiții o hidroliză apreciabilă a ADN.

Întrucît $HClO_4$ 1 N la +4°C în timp de 18 ore hidrolizează doar parțial ARN, ne-am propus să urmărim efectul temperaturii asupra gradului de hidroliză, pentru a stabili condițiile în care $HClO_4$ 1 N hidrolizează complet ARN. Rezultatele sînt date în tabela 4. Se constată că în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N" concentrația acizilor nucleici crește o dată cu ridicarea temperaturii de hidroliză, în timp ce în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N" scade. ARN este prezent în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N" numai în intervalul de temperaturi +4—+30°C. Aceasta înseamnă că ARN este hidrolizat total de către $HClO_4$ 1 N la +40°C în timp de 4 ore. Pe de altă parte, se poate observa că ADN apare în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N" în jurul temperaturii de +50°C; deci, ADN devine hidrolizabil cu $HClO_4$ 1 N începînd cu această temperatură. Reiese că $HClO_4$ 1 N la +40°C în timp de 4 ore hidrolizează total ARN și de loc ADN. Așadar, lucrînd pe sucuri vacuolare și fracțiuni de suc plasmatic din frunze de porumb, putem realiza o dozare separată a ARN de ADN, hidrolizînd precipitatul întîi cu $HClO_4$ 1 N la +40°C timp de 4 ore și apoi cu $HClO_4$ 0,5 N la +70°C timp de 20 min.

CONCLUZII

Din cele prezentate putem face următoarele observații referitoare la aplicarea metodei Ogur-Rosen pentru dozarea acizilor nucleici în sucurile vacuolar și plasmatic obținute din frunzele de porumb:

1. $HClO_4$ 1 N la +4°C în timp de 18 ore hidrolizează parțial ARN și foarte slab sau de loc ADN.

2. $HClO_4$ 1 N la +40°C în timp de 4 ore hidrolizează total ARN și de loc ADN. Deci, în cazul materialului folosit de noi este recomandată hidroliza cu $HClO_4$ 1 N la +40°C timp de 4 ore, în loc de +4°C timp de 18 ore, cum este prevăzut în metoda Ogur-Rosen.

3. Dozarea spectrofotometrică a acizilor nucleici în hidrolizatele respective trebuie cuplată cu dozări colorimetrice ale pentozelor.

4. În tratarea preliminară a precipitatului este suficientă cîte o singură operație de spălare în fiecare etapă.

Prezentat la redacție la 2 aprilie 1970

Institutul de biochimie, București

Tabela 4

Concentrația acizilor nucleici (μg/ml) în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 1 N" obținute timp de 4 ore la diferite temperaturi și în „hidrolizatele cu $HClO_4$ 0,5 N" obținute din sucurile vacuolare ale frunzelor de porumb

Nr. exp.	Hidrolizatul cu $HClO_4$ 1 N								Hidrolizatul cu $HClO_4$ 0,5 N							
	temperatura (°C)															
	4	10	20	30	40	50	60	70	4	10	20	30	40	50	60	70
	ARN + ADN (dozare spectrofotometrică)															
1	12	—	14	33	37	58	65	60	31	—	24	22	14	2	2	1
2	15	25	42	56	—	57	61	—	53	48	20	8	—	6	6	—
3	12	15	24	30	—	37	38	—	32	27	18	10	—	3	2	—
	ARN (dozare colorimetrică)															
1	9	—	14	35	46	48	68	70	20	—	16	14	0	0	0	0
2	20	30	43	46	—	60	66	—	38	14	4	0	—	0	0	—
3	17	17	20	24	—	32	46	—	14	12	4	0	—	0	0	—
	ADN (dozare colorimetrică)															
1	0	—	0	0	0	7	12	16	16	—	14	14	14	12	4	2
2	0	0	0	0	—	4	16	—	14	12	12	12	—	10	10	—
3	0	0	0	0	—	4	14	—	14	14	14	14	—	12	7	—

BIBLIOGRAFIE

1. M. Ogur, G. Rosen, Arch. Biochem.,**25**, 262 (1950).
2. W. A. Cassel, J. Bact., **59**, 185 (1950).
3. E. Basler, B. Commoner, Virology, **2**, 13 (1956).
4. H. G. Loeb, E. Dickinson, Arch. Biochem. Biophys., **57**, 515 (1955).
5. M. Ogur ș.a., Arch. Biochem. Biophys., **40**, 175 (1952).
6. Eugen Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969, p. 199.
7. E. Macovschi, C. Mușolan, Rev. roum. Biochim., **6**, 89 (1969).
8. Y. Moule, Arch. Sci. Physiol., **7**, 241 (1953).
9. K. Burton, Biochem. J., **62**, 315 (1956).

SOME CONSIDERATIONS REGARDING THE USE OF "OGUR-ROSEN" METHOD FOR THE ESTIMATION OF NUCLEIC ACIDS IN THE VACUOLAR AND PLASMATIC SAPS OF MAIZE LEAVES

SUMMARY

The possibility of using the "Ogur-Rosen" method for the estimation of nucleic acids in both vacuolar and plasmatic saps obtained from maize leaves was investigated. One has found that in the previous treatment of the samples a single washing in every step is needed. 1 N $HClO_4$ at +4°C during a period of 18 hours was shown to hydrolyse only a part of the total amount of RNA and almost none of DNA. A complete hydrolysis of RNA is reached by 1 N $HClO_4$ at +40°C, during a period of 4 hours. Under these conditions no DNA hydrolysis occurs. Therefore, a good separation of RNA from DNA can be obtained by performing hydrolysis with 1 N $HClO_4$ at +40°C, during 4 hours.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 307–311 (1970)

PIGMENȚII CAROTINOIDICI DIN PLANTE RECOLTATE DIN REGIUNI MONTANE ȘI SUBALPINE

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotinoidici din florile unor plante recoltate din regiuni montane și subalpine. Se constată o predominare a carotinoidelor oxigenate, în special a epoxizilor și xantofilelor, a căror cantitate sporește o dată cu altitudinea.

Prin numeroase cercetări s-a stabilit că pigmenții carotinoidici din plante depind atît de natura speciei, cît și de influența factorilor de mediu și de faza de vegetație [1], [2], [3], [4].

Din cercetarea pigmenților carotinoidici la un număr mai mare de plante din specii endemice [5]—[7], recoltate din regiuni montane și subalpine, a reieșit că în florile respective predomină carotinoidele oxigenate, în special xantofilele și epoxizii.

Factorii de mediu din regiunile montane și subalpine se caracterizează în general printr-o scădere a temperaturii și a presiunii atmosferice, printr-o împutinare a bioxidului de carbon și a oxigenului, printr-o mărire a radiațiilor ultraviolete și a precipitațiilor [8].

În prezenta lucrare se aduce o nouă contribuție la cunoașterea influenței factorilor de mediu asupra naturii și cantității pigmenților carotinoidici, prin cercetarea carotinoidelor din unele plante neendemice, din genuri diferite, recoltate din regiuni montane și subalpine.

MATERIAL ȘI METODE

S-au determinat pigmenții carotinoidici atît din florile de *Potentilla ternata* C. Roch, *Geum montanum* L., *Hipochoeris uniflora* Will, recoltate din Munții Retezat, cît și din florile de *Caltha laeta* Sch. N. K. și *Taraxacum officinale* Wel., recoltate din regiunile indicate în tabelele 2 și 3.

Pentru determinarea pigmenților carotinoidici s-a folosit material proaspăt, recoltat între anii 1967 și 1969.

Extragerea pigmenților s-a făcut cu un amestec de eter de petrol — acetonă — metanol 5 : 3 : 1.

Separarea carotinoidelor s-a efectuat prin cromatografie pe coloană (35/3,5 cm), utilizînd ca adsorbant un amestec de oxid de magneziu și nisip, în raport de 1 : 2 în greutate. Developarea s-a făcut cu amestec

de eter de petrol și benzen, pînă la 20%. Pentru cromatograme de amestec, cu pigmenți carotinoidici extrași din alte plante, s-a utilizat și cromatografia în strat subțire, folosind ca adsorbant oxidul de magneziu, iar ca developant amestecul de eter de petrol — benzen — acetonă 6 : 3 : 1.

Pigmenții carotinoidici din flori sînt însoțiți de pigmenți flavonoidici, de care se separă prin saponificare. Saponificarea s-a făcut cu soluție etanolică de hidroxid de potasiu 12%, timp de 40 de minute, la 45°C.

Identificarea și determinarea pigmenților carotinoidici s-au făcut prin metode cromatografice, spectroscopice și colorimetrice, ca și în lucrările anterioare [5], [6], [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au cercetat mai întîi pigmenții carotinoidici din florile de *Potentilla ternata* C. Koch, *Geum montanum* L., *Hipochoeris uniflora* Will, recoltate din Munții Retezat, de la altitudini de 1 500—2 000 m, specii necercetate pînă în prezent sub aspectul pigmenților carotinoidici. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul de carotinoide din florile de *Potentilla ternata*, *Geum montanum* și *Hipochoeris uniflora* (mg/100 g flori proaspete)

Carotinoide	*Potentilla ternata*	*Geum montanum*	*Hipochoeris uniflora*
a. *Carotinoide hidrocarburice*			
α-carotina	0,06	0,04	—
β-Carotina	1,20	1,20	0,70
Total:	1,26	1,24	0,70
b. *Xantofile*			
Luteina	0,63	0,76	0,80
Criptoxantina	0,20	0,40	—
Zeaxantina	1,00	0,85	0,30
Total:	1,83	2,01	1,10
c. *Carotinoide epoxidice*			
Eloxantina	2,00	1,50	1,20
Epoxid de criptoxantină	0,40	—	—
Anteraxantina	0,26	0,12	—
Violaxantina	0,89	0,34	0,40
Flavoxantina	1,40	—	0,50
Total:	4,95	1,96	2,10

Din rezultatele obținute reiese că în plantele menționate predomină sub aspect cantitativ carotinoidele epoxidice și xantofilele. Dintre carotinoidele hidrocarburice s-au identificat α- și β-carotina, iar dintre furanoizi numai flavoxantina. Epoxizii sînt mai numeroși și provin atît din carotinoide cu structură α-iononică, cît și din cele cu structură β-iononică. Raportul dintre carotinoidele oxigenate și cele hidrocarburice este cuprins între 3,2 și 5,5, asemănător plantelor endemice [5], [6], [7].

Pentru a cunoaște cît mai bine influența factorilor de mediu din regiunile montane și subalpine și pentru a evita formularea unor interpretări greșite, datorită existenței întîmplătoare a aceloraşi pigmenți carotinoidici la plante din genuri diferite, care trăiesc în aceleași condiții ecologice, s-au determinat în continuare carotinoidele din aceleași specii, recoltate de la altitudini diferite și din locuri diferite. S-au cercetat astfel carotinoidele florale din *Caltha laeta* Sch. N.K. și *Taraxacum officinale* Wel., specii comune și cunoscute sub aspectul pigmenților carotinoidici [9], [10], [11]. Determinările cantitative sînt trecute în tabelele 2 și 3.

Tabela 2

Conținutul de carotinoide din florile de *Caltha laeta* la diferite altitudini (mg/100 g flori proaspete)

Carotinoide	Făget-Cluj 500 m	Măgoaja-Dej 900 m	Munții Retezat 1 800—2 000 m
a. *Carotinoide hidrocarburice*			
α-Carotina	0,62	0,40	0,23
β-Carotina	1,80	1,20	0,70
Total:	2,42	1,60	0,93
b. *Xantofile*			
Luteina — (*trans*)	2,00	2,40	2,60
Luteina — (*cis*)	1,65	1,90	2,10
Total:	3,65	4,30	4,70
c. *Carotinoide epoxidice*			
Eloxantina	1,80	2,30	3,00
Violaxantina	0,25	0,40	0,90
Trolixantina	0,36	0,70	1,20
Total:	2,41	3,40	5,1

Tabela 3

Conținutul de carotinoide din *Taraxacum officinale* la diferite altitudini (mg/100 g flori proaspete)

Carotinoide	Cluj 500 m	Stîna de Vale 1 000 m	Munții Retezat 1 500—1 600 m
a. *Carotinoide hidrocarburice*			
β-Carotina	1,20	1,00	0,65
b. *Xantofile*			
Luteina	1,18	1,30	1,55
Criptoxantina	0,08	0,10	0,12
Total:	1,26	1,40	1,67
c. *Carotinoide epoxidice*			
Eloxantina	0,26	0,48	0,65
Violaxantina	0,32	0,57	0,70
Taraxantina	1,30	1,60	1,90
Flavoxantina	0,20	0,35	0,60
Total:	2,08	3,00	3,85

După cum rezultă din datele experimentale, factorii de mediu din regiunile montane și subalpine favorizează formarea carotinoidelor epoxidice și a xantofilelor. Concomitent cu creșterea altitudinii, la speciile cercetate se produc o creștere a xantofilelor și a epoxizilor și o micșorare a carotinoidelor hidrocarburice. Epoxizii cresc într-o proporție mai mare decît xantofilele.

Cantitatea cu care carotinoidele oxigenate (epoxizi și xantofile) cresc o dată cu altitudinea este mai mare decît aceea cu care scad în același timp carotinoidele hidrocarburice, ceea ce ne arată că în plante epoxizii și xantofilele se formează nu numai din carotinoide hidrocarburice ciclice, ci și din alți precursori.

Dintre factorii de mediu care influențează mai mult formarea epoxizilor și a xantofilelor, un rol important au, probabil, radiațiile cu lungime de undă mai mică (ultraviolete) și temperatura relativ scăzută. Un argument în favoarea acestei presupuneri este constatarea că și la plantele care înfloresc primăvara de timpuriu, ca *Forsythsia intermedia*, *Tussilago farfara*, diferite specii de *Ranunculus* etc. [10], [11], [12], [13], cînd cantitatea de radiații cu lungime de undă mică este mai mare și temperatura mai joasă, florile respective conțin în cantitate mai mare epoxizi și xantofile, dar mai puține carotinoide hidrocarburice.

Predominarea carotinoidelor oxigenate la speciile din regiuni montane și subalpine, precum și la plantele ce înfloresc primăvara de timpuriu poate constitui un fenomen de adaptare a plantelor la condițiile de viață ale mediului înconjurător. După cum algele marine (verzi, brune, albastre, roșii), care trăiesc la diferite adîncimi, conțin în cantitate mai mare pigmenți carotinoidici (fucoxantina) și ficobilinici (ficocianina și ficoeritrina), capabili să absoarbă radiațiile luminoase ce pătrund pînă la ele (și se aranjează pe verticală în funcție de lungimea de undă a radiațiilor absorbite), este posibil ca și la plantele superioare natura carotinoidelor (tipurile de carotinoide) predominante să depindă de lungimea de undă. Epoxizii, furanoizii și xantofilele cu structură α-iononică, absorb radiații cu lungime de undă mai mică din regiunea albastră și violetă a spectrului luminii solare, radiații care sînt bogate în regiunile montane și subalpine.

În florile plantelor cercetate nu s-au pus în evidență carotinoide cetonice sau carotinoide cu sistem polienic mai bogat, care să absoarbă radiații cu lungime de undă mai mare.

CONCLUZII

Factorii de mediu din regiunile montane și subalpine favorizează formarea carotinoidelor epoxidice și a xantofilelor.

Concomitent cu creșterea altitudinii au loc o creștere a epoxizilor și xantofilelor și o micșorare a carotinoidelor hidrocarburice.

Dintre epoxizi se găsesc în cantitate mai mare eloxantina, violaxantina și anteraxantina, iar dintre furanoizi flavoxantina.

Prezentat la redacție la 14 februarie 1970

Catedra de biochimie, Institutul agronomic „Dr. P. Groza" Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. M. Buhicz, Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Biol., **17**, 271 (1969).
2. R. A. Edwards, F. H. Reuter, J. Food Sci., **2**, 66 (1965).
3. T. W. Goodwin, *Stravnitelinaia biohimia karotinoidov*, Izdatelistvo Inostrannoi Literaturî, Moscova, 1954, p. 12.
4. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, Londra—New York, 1965, p. 143.
5. G. Neamțu, V. Tămaș, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **2**, 337 (1965).
6. G. Neamțu, V. Tămaș, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **4**, 59 (1967).
7. G. Neamțu, E. Vicol, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **5**, 223 (1968).
8. E. Pop, N. Sălăgeanu, St. Péterfi, H. Chirilei, *Fiziologia plantelor*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1964, vol. I, p. 147.
9. P. Karrer, E. Jucker, Helv. chim. Acta, **30**, 1774 (1947).
10. P. Karrer, H. Notthafft, Helv. chim. Acta, **15**, 1195 (1932).
11. P. Karrer, H. Salomon, Helv. chim. Acta., **13**, 1063 (1930).
12. P. Karrer, E. Jucker, J. Rutschmann, K. Steinlin, Helv. chim. Acta, **28**, 1146 (1945).
13. P. Karrer, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Verlag, Basel—Stuttgart, 1958, p. 110.

CAROTENOID PIGMENTS IN PLANTS ORIGINATING FROM MOUNTAINOUS AND SUBALPINE REGIONS

SUMMARY

The content of carotenoid pigments of some flowers originating from mountainous and subalpine regions was investigated.

The oxygenated carotenoids (epoxy-carotenoids and mainly xanthophylls) prevailed, their content increasing with the altitude.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 313–318, (1970)

ACTIVITATEA ŞI IZOENZIMELE LACTATDEHIDROGENAZEI DIN LICHIDUL ALANTOIDIAN AL OUĂLOR EMBRIONATE, INOCULATE CU VIRUSUL GRIPAL A (PR. 8)

E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN şi I. MOISA

Rezumat. — Virusul gripal A, tulpina PR.8, inoculat în lichidul alantoidian al ouălor embrionate determină modificări ale activităţii enzimatice LDH, precum şi ale modelului izoenzimelor respective.

Într-o lucrare anterioară [1] am pus în evidenţă faptul că modelul izoenzimelor lactatdehidrogenazei (LDH) din serul sanguin de iepure, precum şi activitatea acestei enzime se modifică sub acţiunea dermovaccinei. Modificările semnalate comportă atît creşterea activităţii izoenzimei LDH_1, respectiv schimbarea raportului LDH_1/LDH_2, cît şi creşterea semnificativă a activităţii totale LDH la anumite intervale de timp de la pătrunderea virusului.

În continuarea acestor cercetări şi pe baza premiselor stabilite anterior [1], ne-am propus să urmărim în această lucrare activitatea LDH, precum şi comportarea izoenzimelor respective din lichidul alantoidian al ouălor embrionate, inoculate cu virusul gripal A, tulpina PR.8. Aceste investigaţii se încadrează în contextul modificărilor biochimice induse de pătrunderea şi multiplicarea virusului în celulă [2], [3], [4]. Totodată, modelul izoenzimatic LDH poate reflecta, într-un anumit grad, alterarea unor procese metabolice, ca o consecinţă a acţiunii unui agent patogen.

Astfel, scopul lucrării este atît de a evidenţia comportarea activităţii LDH la diferite intervale de timp de la inocularea virusului, cît şi de a deduce semnificaţia activităţii acelor tipuri de izoenzime LDH care suferă modificări în raport cu prezenţa şi multiplicarea virusului gripal.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate cu virusul gripal A, tulpina PR.8, menţinută în laborator timp de 14 pasaje intraalantoidiene pe ouă embrionate de găină. Titrul hemaglutinant a fost de 1/4096, iar titrul infectant de $10^{8,1}$.

S-a lucrat pe ouă embrionate în vîrstă de 10 zile, inoculate în cavitatea alantoidiană cu 0,1 ml lichid alantoidian infectant, diluat $1 \cdot 10^{-3}$.

Ouăle de referinţă au fost inoculate în aceleaşi condiţii cu 0,1 ml ser fiziologic.

Incubarea s-a realizat la +37°C. La intervale de timp de 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 şi 72 de ore, ouăle (cîte 5 din cele inoculate cu virus şi cîte 5 din cele normale) au fost luate de la incubator şi ţinute timp de 30 de minute la —20°C. Apoi au fost păstrate la +4°C timp de 24 de ore, pînă la recoltarea lichidului alantoidian. O parte din lichidul alantoidian recoltat a fost folosit pentru testul de hemaglutinare, iar o altă parte a fost centrifugat la 4 000 × g (+4°C) timp de 15 minute. Lichidul obţinut după centrifugare a fost utilizat pentru dozarea activităţii LDH şi analiza electroforetică a izoenzimelor respective.

Pentru testul de hemaglutinare s-au folosit 12 tuburi de hemoliză, în care s-au adăugat 0,25 ml tampon veronal de pH 7,4. În primul tub s-a măsurat 0,25 ml antigen, diluat 1/2 ; ulterior s-au făcut diluţii seriate, după care s-au adăugat în fiecare tub 0,25 ml diluant şi 0,50 ml suspensie de eritrocite de pasăre 0,5%. Citirea s-a efectuat după o oră la +4°C. S-a considerat pozitiv ultimul tub de hemoliză în care s-a produs aglutinarea a 50% din eritrocite.

Activitatea enzimatică LDH a fost determinată spectrofotometric după tehnica descrisă într-o lucrare anterioară [1].

Analiza electroforetică pentru punerea în evidenţă atît a proteinelor, cît şi a izoenzimelor LDH s-a efectuat în gel de amidon, în sistem de tampon discontinuu, după varianta Poulik [5]. Cantitatea de proteină supusă fracţionării electroforetice a fost de 25 γ în următoarele condiţii de migrare : tensiune 16 V/cm, intensitate 3 mA/cm, durata 120 de minute, temperatura +8 ± 2°C. După secţionarea prealabilă a gelului, o jumătate a fost destinată pentru evidenţierea proteinelor, iar cealaltă jumătate pentru revelarea izoenzimelor. Aceasta s-a efectuat prin procedeul imersiei, după tehnicile recomandate şi utilizate de către unul din noi în lucrări anterioare [6], [7]. Pentru realizarea reacţiei enzimatice s-a folosit ca substrat lactatul de sodiu, ca derivat de tetrazoliu TNBT, iar ca acceptori intermediari NAD şi fenazinmetosulfatul.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele obţinute indică faptul că prezenţa virusului gripal A (PR.8) inoculat în ouăle embrionate determină anumite modificări atît la nivelul activităţii enzimatice, cît şi la cel al izoenzimelor LDH, ca reflectare a procesului patogen indus de pătrunderea şi multiplicarea acestui virus ARN.

Astfel, din figura 1, unde este prezentată curba activităţii totale a lactatdehidrogenazei, se constată modificări evidente ale acestei activităţi în lichidul alantoidian al ouălor infectate cu virus în comparaţie cu cele neinfectate. Deşi la ouăle neinfectate aceste modificări, respectiv creşteri ale activităţii enzimatice, se semnalează încă din primele 12 ore, totuşi maximul de creştere se produce după 24, respectiv 36 de ore. Dacă în aceste prime 24 de ore valorile activităţii LDH sînt duble — sau aproape duble — în raport cu cele din lichidul alantoidian al ouălor normale, la 36 de ore după inoculare activitatea LDH din lichidul alantoidian al ouălor

infectate devine de aproximativ 5 ori mai mare, pentru ca la 48 şi, respectiv, 72 de ore să crească de 9 ori. Această exacerbare a activităţii LDH poate fi atribuită perturbărilor la nivelul proceselor glicolitice declanşate de către pătrunderea şi multiplicarea virusului [8].

Paralel cu determinarea activităţii LDH, s-a urmărit şi detectarea prezenţei virusului prin reacţia de hemaglutinare. După cum rezultă din

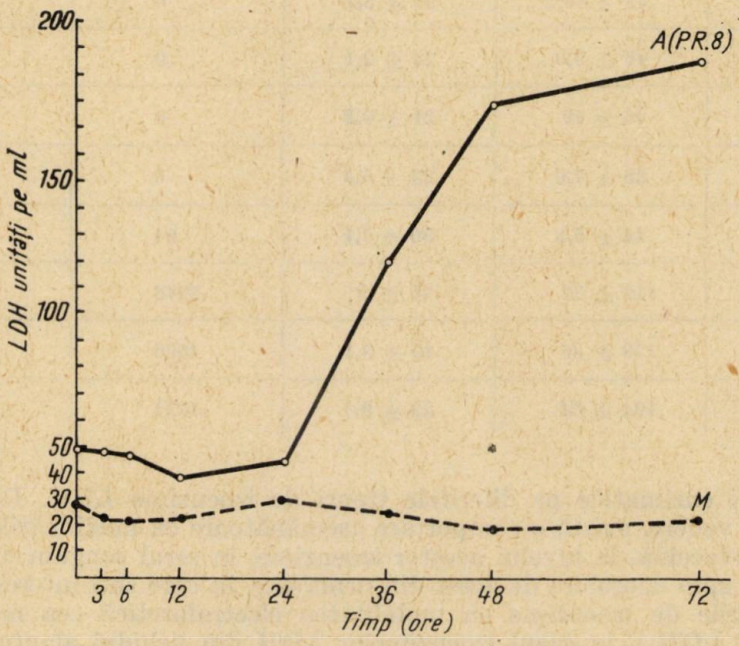


Fig. 1. — Activitatea lactatdehidrogenazei din lichidul alantoidian al ouălor embrionate normale (*M*) şi inoculate cu virusul gripal (*A*).

tabela 1, activitatea se poate corela cu testul de hemaglutinare, care devine pozitiv, începînd de la 24 de ore de la inoculare, deci de la o etapă în care activitatea LDH începe să capete valori mari. La 36 şi, respectiv, 48 de ore, titrul hemaglutinant prezintă cele mai ridicate valori, la 72 de ore constatîndu-se însă o scădere a sa.

Anumite modificări în lichidul alantoidian al ouălor embrionate infectate cu virusul gripal A (PR.8) se sesizează şi la nivelul izoenzimelor LDH. După cum reiese din figura 2, spectrul electroforetic al acestor izoenzime din lichidul alantoidian al ouălor normale se compune din cele cinci tipuri cunoscute, care se deosebesc prin mobilitatea lor electroforetică şi prin repartiţia activităţii enzimatice. Conform modelului izoenzimatic obţinut în condiţiile noastre experimentale, această activitate este localizată la oul neinfectat în special pe tipurile de izoenzime LDH_5 şi LDH_1. Activitatea celorlalte tipuri este evident mai mică, izoenzima LDH_3 fiind abia decelabilă.

Din figura 2, în care sînt prezentate şi modelele izoenzimatice LDH din lichidul alantoidian al ouălor inoculate cu virusul gripal, se constată că acţiunea acestui virus determină modificarea în special a distribuţiei

Tabela 1

Activitatea lactatdehidrogenazei şi titrul hemaglutinant din lichidul alantoidian al ouălor embrionate normale şi inoculate cu virusul gripal A (PR.8) (cifrele reprezintă media a 5 determinări)

Ore după inoculare	Activitate LDH (u/ml)		Titrul hemaglutinant	
	virus A (PR.8)	martor	virus A (PR.8)	martor
1	49 ± 13,2	29 ± 3,7	0	0
3	48 ± 5,9	23 ± 2,1	0	0
6	46 ± 19	21 ± 6,3	0	0
12	38 ± 7,6	23 ± 5,4	0	0
24	44 ± 6,3	30 ± 7,1	64	0
36	119 ± 32	25 ± 9	2048	0
48	178 ± 36	19 ± 3,1	4096	0
72	194 ± 64	22 ± 9,7	1024	0

activităţii enzimatice pe diferitele tipuri de izoenzime LDH. Din acest punct de vedere, există o comportare asemănătoare cu modificările induse de dermovaccină, la nivelul acestor izoenzime, în serul sanguin de iepure [1]. Dar, spre deosebire de acest din urmă caz, în care sînt interesate mai ales tipurile de izoenzime cu mobilitatea electroforetică cea mai mare (LDH_1 şi LDH_2), în cazul izoenzimelor LDH din lichidul alantoidian al ouălor inoculate cu virusul gripal modificările de activitate privesc îndeosebi tipurile LDH_4 şi LDH_5, cu mobilitatea cea mai redusă, şi într-o mai mică măsură tipul LDH_1.

Aceste modificări, caracterizate prin creşterea activităţii tipurilor de izoenzime LDH_4 şi LDH_5, devin evidente însă după 36 de ore de la inocularea virusului, deci după aproximativ 12 ore de la pozitivarea reacţiei de hemaglutinare. În cazul oului normal nu se semnalează modificări semnificative în modelul izoenzimelor LDH la toate intervalele de timp după care s-au făcut determinările (1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 şi 72 de ore), repartiţia activităţii enzimatice fiind aproximativ aceeaşi între diferitele tipuri de izoenzime. În cazul infecţiei cu virusul gripal, izoenzimele LDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate nu prezintă diferenţe semnificative în raport cu cele normale pînă la 36—48 de ore de la inoculare. Este de menţionat totuşi că în acest interval se constată, în general, că activitatea tuturor tipurilor de izoenzime LDH devine mai accentuată decît la ouăle normale.

Într-un stadiu ulterior, şi anume de la 36—48 de ore de la inocularea virusului, se produce o intensificare în special a activităţii izoenzimelor LDH_4 şi LDH_5. Această caracteristică se menţine şi la stadiul de 72 de ore.

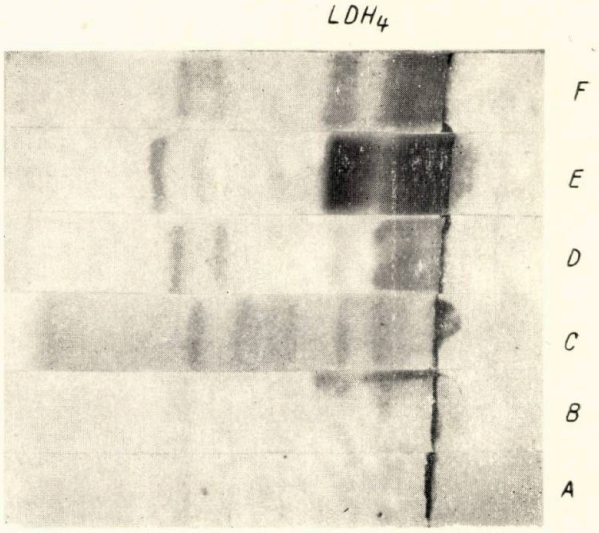


Fig. 2. — Izoenzimele lactatdehidrogenazei din lichidul alantoidian al ouălor embrionate normale ($A = 12$, $B = 36$, $C = 48$ ore) și inoculate cu virusul gripal ($D = 36$, $E = 48$, $F = 72$ ore).

Conform datelor noastre, rezultă că stadiul de 48—72 de ore reflectă instalarea modificărilor biochimice ca răspuns la acţiunea virusului gripal asupra metabolismului celular normal. Compararea datelor obţinute scoate în evidenţă existenţa unei corelaţii între comportarea, respectiv modificarea modelului izoenzimelor LDH şi modificarea activităţii enzimatice totale, în prezenţa virusului gripal A (PR.8). Într-adevăr, exaltarea activităţii LDH, constatată la 36—48 de ore, corespunde modificărilor semnalate la nivelul izoenzimelor LDH din lichidul alantoidian al ouălor infectate cu virus, modificări care se sesizează la acelaşi interval de timp de la inocularea virusului gripal. Aceste date sugerează o intensificare a metabolismului anaerob sub acţiunea acestui virus, a cărui multiplicare este condiţionată şi de energia provenită din procesele de tip glicolitic. De altfel, activitatea crescută a izoenzimelor LDH_4 şi LDH_5, care reflectă un profil metabolic anaerob, a fost constatată, după cum am menţionat, în cazul acţiunii virusului gripal A (PR.8). Desigur, datele semnalate reprezintă numai unele din aspectele care caracterizează, în fond, mecanismul complex al relaţiilor virus — celulă-gazdă [9]—[12].

CONCLUZII

Virusul gripal A, tulpina PR.8, inoculat cu lichidul alantoidian al ouălor embrionate, determină modificări la nivelul activităţii LDH totale, precum şi la nivelul izoenzimelor respective.

— Activitatea enzimatică LDH manifestă creşteri încă din primele ore de la inocularea virusului, atingînd valori maxime după 36 de ore.

— Modelul izoenzimelor LDH se modifică după 36—48 de ore de la inocularea virusului, în sensul creşterii activităţii tipurilor cu mobilitatea electroforetică cea mai redusă (LDH_4 şi LDH_5).

Prezentat la redacţie la 2 martie 1970

Institutul de virusologie „Ştefan S. Nicolau" şi Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Şerban, E. Prahoveanu, St. cerc. biochim., **13**, 79 (1970).
2. V. E. Gilbert, Virology, **21**, 609 (1963).
3. B. W. J. Mahy, K. E. K. Rowson, M. H. Salaman, Virology, **23**, 528 (1964).
4. S. Kalter, A. K. Eugster, P. J. Albert, D. Cohen, Arch. ges. Virusforsch., **20**, 180 (1967).
5. M. D. Poulik, Nature, **180**, 1477 (1957).
6. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **5**, 325 (1968).
7. M. Şerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim., **12**, 173 (1969).
8. E. Kun, J. E. Ayling, B. N. Siegel, Science, **131**, 1318 (1960).
9. D. Grieff H. T. Blumenthal, H. Pinkerton, J. exp. Med., **91**, 335 (1950).
10. V. Rilley, F. Lilbey, E. Huerto, D. Bardel, Science, **132**, 546 (1960).
11. G. J. Zemlă, Life Science, **8**, 574 (1963).
12. E. Prahoveanu, I. Moisa, St. cerc. inframicrobiol. (sub tipar).

LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND ISOENZYMES IN ALLANTOIDIAN FLUID OF EGGS, INOCULATED WITH GRIPPAL VIRUS A (PR.8)

SUMMARY

The inoculation into the allantoidian fluid of embryonate eggs of grippal virus A, strain PR.8, determines some changes in LDH enzyme activity as well as in the isoenzyme pattern.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 3, 319–326 (1970)

RECENZII

M. ROHRLICH, *Kleberforschung. Ein historisch-wissenschaftlicher Versuch* (*Cercetări asupra glutenului. Încercare de prezentare istorico-științifică*), Ed. Moritz Schäfer, Detmld, 1969, 51 p.

În această broșură din seria *Fortschritte der Getreideforschung* (Progrese în cercetarea cerealelor), autorul, binecunoscut cercetător în domeniul biochimiei cerealiere, prezintă istoricul dezvoltării cercetărilor referitoare la gluten, începînd cu separarea lui din făina de grîu, de către Beccari, acum aproape 250 de ani, trecînd prin fracționarea lui cu diferiți solvenți, de către Osborne și școala sa, apoi prin descoperirea de către Sullivan a rolului esențial al grupărilor tiolice și al punților disulfidice ca factori determinanți ai structurii și proprietăților glutenului, pînă la cuceririle cele mai recente ale științei din zilele noastre, dobîndite prin aplicarea metodelor de ultracentrifugare, cromatografie, electro- și imunoelectroforeză, microscopie electronică, marcare cu izotopi etc.

De un deosebit interes este, în cadrul acestei expuneri, descrierea încercărilor de izolare a unor proteine unitare, prin cromatografia pe coloane de schimbători de ioni și prin gel-filtrare, ca și a încercărilor de lămurire a alcătuirii lor, prin hidroliză peptică și prin determinarea compoziției aminoacide, domeniu în care autorul și colaboratorii săi au adus un aport substanțial.

Terminînd cu o scurtă prezentare a concepțiilor actuale despre structura spațială secundară și terțiară a glutenului de grîu, lucrarea se încheie cu concluzia că, pînă în prezent nici procedeele cele mai moderne și subtile, utilizate de altminteri cu succes în studiul altor proteine, încă nu au reușit să facă lumină deplină în ceea ce privește modul de alcătuire a glutenului și legătura dintre acest mod de alcătuire și însușirile tehnologice ale făinurilor de grîu. În aceste direcții se mai deschid largi perspective de cercetare.

Scrisă într-un stil alert și cuceritor și totodată la un înalt nivel științific, această broșură, cu mult mai bogată în conținut decît ar lăsa să se bănuiască cele numai 51 de pagini ale ei, se citește cu o nedezmințită plăcere. Numeroase tabele și figuri (cîte 13) ușurează lectura, iar o listă de 104 indicații bibliografice dă cititorului posibilitatea să caute informații de detaliu la sursele originale.

Prin imaginea de ansamblu pe care o dă asupra domeniului tratat și prin sugestiile ce se pot desprinde din studierea ei, lucrarea profesorului dr. M. Rohrlich poate fi socotită de mare folos pentru biochimiștii preocupați de cercetarea proteinelor în general și a glutenului în special.

H. Slușanschi
I.C.C.P.T. București—Fundulea

M. T. BECK, Chemistry of complex equilibria (*Chimia echilibrelor combinațiilor complexe*), Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1970, 285 p.

Lucrarea cunoscutului chimist, fizician și anorganician din Ungaria tratează problemele echilibrelor din soluțiile apoase ale combinațiilor complexe : disocierea combinației complexe de ion central și liganzi ; asocierea de către ionii complecși a unor ioni de semn contrar, în sfera exterioară de coordinație ; protonarea liganzilor. Nu sînt tratate echilibrele ce apar în reacțiile de substituție a liganzilor și nici cele ce rezultă în urma interacțiunilor cu solventul.

Se încearcă, cu succes de altfel, o prezentare cît mai „chimică" cu putință a acestor fenomene, greu de abordat și de tratat fără un aparat matematic elaborat, precum și o exhaustivă trecere în revistă a metodelor de care chimistul dispune pentru determinarea diferitelor constante de echilibru. Cartea nu se transformă însă într-un manual de lucrări practice, metodele de lucru fiind prezentate sub aspect teoretic, analizate critic și însoțite de numeroase trimiteri bibliografice.

Lucrarea este împărțită în 12 capitole, fiecare însoțit de o bibliografie. Aceasta este cercetată pînă la sfîrșitul anului 1968 și cuprinde, în total, 1003 trimiteri.

Lucrarea reprezintă un instrument de lucru foarte folositor cercetătorilor care se preocupă de problemele legate de echilibrele combinațiilor complexe, și anume nu numai chimiștilor anorganicieni, ci și (sau, poate, mai ales) celor de altă specialitate.

Engleza un pic greoaie în care este scrisă cartea nu reduce cu nimic accesibilitatea și utilitatea ei.

Liviu Mihai Băloiu
Academia de științe economice,
București

Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Diuretica vol. XXIV (*Tratat de farmacologie experimentală. Diureticele*), sub red. G. Fülgraff și colab., Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1969.

Tratatul are drept colaboratori o seamă de oameni de știință, profesori cu renume în diferite centre universitare, și reprezintă sinteza rapoartelor și discuțiilor susținute la Simpozionul internațional de la Feldafing, din iunie 1968.

Materialul documentar, bogat ilustrat, tratează despre metabolismul rinichiului, procese de transport la nivelul membranelor și tubilor renali, relațiile lor cu metabolismul, bazele celulare ale acțiunii hormonilor, influența hormonilor asupra proceselor renale de transport, cercetarea experimentală a diureticelor, combinarea diferitelor diuretice, aplicarea lor în diferite boli.

În primul capitol se tratează problema funcției glomerulare, în speță filtrarea și transportul electroliților — sodiu, potasiu, calciu, clor — la nivelul tubilor și epiteliului renal, mecanismul de concentrare și formele de diureză.

Urmează, în capitolul următor, descrierea din punct de vedere chimic a diureticelor pe bază de mercur, repartiția lor în organism la diferite nivele și acțiunea lor farmacologică asupra rinichiului și altor organe.

În capitolul 3 se subliniază efectele acute și cronice ale inhibiției carboanhidrazei renale.

În capitolele următoare (4, 5, 6) se tratează pe larg efectele unor medicamente, în speță diuretice tiazidice, furosemide și grupa substanțelor înrudite cu acidul etacrinic, asupra balanței apă-electroliți la nivelul rinichiului.

Urmează legătura dintre anumiți hormoni și funcțiile renale (cap. 7, 8, 9), autorii referindu-se la acțiunea renală și extrarenală a aldosteronului, a unor antimetaboliți, ca antialdosteronul, și a pseudoantialdosteronului.

Ultimele trei capitole tratează ca agenți diuretici hormonii glucocorticoizi, unii inhibitori ai hormonilor corticosteroizi, cationii difuzabili și xantinderivații.

Lucrarea prezintă o importanță deosebită, ținînd seama de rolul pe care-l joacă rinichiul în reglarea balanței apă-electroliți pentru întregul organism, de aspectele dereglării acestei funcții într-o serie de maladii specifice și nespecifice rinichiului și de rolul medicamentelor pentru echilibrul hidrosalin.

Mioara Cârsteanu
Institutul de biochimie,
București

G. H. BELL, J. N. DAVIDSON, H. SCARBOROUGH, *Textbook of Physiology and Biochemistry* (*Manual de fiziologie și biochimie*), E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh—Londra, 1968, 1219 p.

Ca și edițiile anterioare, cea de-a 7-a ediție a acestui manual valoros prezintă la zi principiile și datele de bază din domeniul fiziologiei și biochimiei, reușind să îmbine armonios studiul biochimic, la nivelul molecular biologic, cu cel fiziologic, la nivel de organ sau organism întact.

Materialul, foarte vast, este împărțit în 54 de capitole. Pentru o înțelegere mai completă și mai aprofundată a funcțiilor fiziologice ale diferitelor organe și sisteme sînt prezentate mai întîi noțiunile generale de biochimie privind principalele clase de componenți celulari, reacțiile biochimice și catalizatorii lor, enzimele, precum și principalele căi ale metabolismului intermediar. În continuare sînt analizate principalele funcții ale organismului și ale diferitelor organe. Sînt tratate astfel în amănunțime nutriția, funcția motorie, respirația, circulația, funcția nervoasă, excreția și reproducerea. Un capitol special se ocupă de diviziunea celulară și ereditate, un altul de creștere și îmbătrînire.

Calitatea de bază a acestei lucrări o constituie însă modul logic și accesibil în care sînt expuse problemele tratate. La aceasta contribuie și ilustrarea bogată și foarte bine realizată, alcătuită din figuri, grafice, tabele; este prezentat astfel un bogat material experimental, care ilustrează elegant faptele teoretice.

Bibliografia, foarte bogată de altfel, este prezentată la sfîrșitul fiecărui capitol. Lucrarea cuprinde și un supliment cu unitățile de măsură folosite în mod obișnuit în fiziologie și biochimie, un tabel cu greutatea medie în funcție de înălțime și vîrstă și un index de subiecte.

Ținînd seama de toate cele de mai sus, se poate afirma că lucrarea poate servi ca un admirabil curs de fiziologie și biochimie pentru studenții în medicină și, în același timp, dă un rezumat al teoriilor moderne în fiziologie și biochimie pentru biochimiști și medicii practicanți care vor să revadă principiile de bază.

Olguța Macovschi
Institutul de biologie,
București

THOMAS E. BARMAN, Enzyme Handbook (*Manual de enzime*), vol. I și II, Springer Verlag, Berlin, 1969, 927 p.

Manualul de față este în realitate un catalog care cuprinde fișele a 800 de enzime, clasificate conform listei Comisiei internaționale pentru enzime din 1965. Fișa unei enzime cuprinde numele curent al enzimei, denumirea ei sistematică, reacția catalizată, constanta de echilibru, greutatea moleculară, activitatea specifică, lista de inhibitori, date privind absorbția luminii, o listă bibliografică.

În introducerea catalogului, autorul precizează teoretic noțiunile folosite la întocmirea fișelor și dă lista enzimelor conform clasificării din 1965. Catalogul se încheie cu un index al enzimelor, cuprinzînd denumirea lor curentă.

Prin modul de alcătuire, catalogul își atinge scopul pentru care a fost editat, oferind datele esențiale, precum și bibliografia necesară pentru o informație mai detaliată privind enzima respectivă.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie,
București

F. MACFARLANE BURNET, Cellular Immunology (*Imunologie celulară*), Melbourne University Press, Cambridge University Press, 1969, 726 p.

Volumul de față dă o privire de ansamblu asupra problemelor fundamentale ale imunologiei în lumina teoriei selecției clonale, datorită autorului. Postulatul central al acestei teorii, anume că producerea anticorpilor este determinată de procese genetice care au loc în linia celulară somatică ce îi elaborează, a fost acceptată de majoritatea imunologilor.

Cartea cuprinde două părți. Partea I prezintă o trecere în revistă a noțiunilor fundamentale ale imunologiei și se adresează unui cerc mai larg de cititori. Răspunsul imun e descris ca un proces darwinian de modificare ereditară și de selecție, rezultat în urma proliferării și distrugerii survenite printre celulele mobile ale mamiferelor.

Partea a II-a, care se adresează specialiștilor, reia și aprofundează problemele prezentate în prima parte. Răspunsul imun e urmărit în toată complexitatea lui, începînd cu rolul celulelor implicate în acest proces, continuînd cu producerea anticorpilor și sfîrșind cu problemele toleranței imunologice și cu bolile autoimune. Se aduc argumente pentru rolul timusului în imunitate, el fiind locul principal în care se produce, pe de o parte, diferențierea celulelor primare în imunocite, iar pe de altă parte eliminarea imunocitelor capabile să reacționeze cu componentele propriului organism. În diferențierea imunocitelor intervin procese celulare și hormonale. Astfel, dezvoltarea celulelor plasmatice e legată de existența unui hormon provenit din țesutul limfoid al intestinului, precum și de tensiunea locală a oxigenului. Imunocitele poartă receptori. În urma unirii dintre antigen și imunocit se eliberează o serie de agenți care determină activitatea imunologică a celulelor vecine, ceea ce are ca rezultat producerea de imunoglobuline nespecifice.

În continuare, autorul se ocupă de rolul macrofagelor, al celulelor eozinofile în răspunsul imun, de natura și modul de producere a anticorpilor. Toleranța imunologică este explicată

ca fiind rezultatul distrugerii tuturor imunocitelor ce poartă receptori cu o anumită aviditate pentru determinantul antigenic corespunzător.

Capitole speciale sînt consacrate fenomenelor de hipersensibilitate de tip întîrziat şi bolilor autoimune. Bolile autoimune sînt considerate ca fiind rezultatul dezechilibrării homeostaziei imunologice.

Obiectivul de bază al cărţii este de a schiţa şi justifica teoria selecţiei clonale a imunităţii şi de a sugera domeniile în care aplicarea ei oferă noi posibilităţi de experimentare şi interpretare.

Doina Onică
Institutul de biochimie,
Bucureşti

G. WEBER, *Advances in Enzyme Regulation* (*Progrese în reglarea enzimatică*), Pergamon Press, Oxford—Londra—New York, 1969, vol. 7, 447 p.

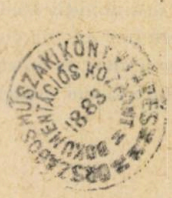
Această apreciată publicaţie anuală continuă şi în acest volum ideea de bază pe care şi-au propus-o iniţiatorii săi, şi anume de a prezenta articole a căror temă este strict legată de reglarea activităţii enzimelor sau a proceselor biosintetice. Subiectele abordate sînt astfel selecţionate, încît să prezinte aspecte în care s-au făcut progrese evidente şi să aducă o serie de precizări, de clarificări necesare cercetărilor ulterioare.

Aspectele cercetate în cele 13 capitole ale volumului sînt următoarele : „Reglarea enzimatică şi cancerul", „Mecanismele glucogenetice din şoarece şi om", „Reglarea schimburilor ciclice în activităţile enzimatice", „Reglarea enzimelor din sistemele izolate", „Reglările din microorganisme", „Reglarea enzimelor din metabolismul carbohidraţilor", „Reglarea enzimelor prin represie şi inactivare", „Mecanismele de control în particulele subcelulare", „Controlul enzimatic al metabolismului corticosteroizilor din glanda adrenală", „Reglarea şi diferenţierea izozimelor", „Reglarea expresiei genelor în celulele normale şi canceroase", „Reglarea enzimelor din celulele canceroase" şi, în sfîrşit, articolul de sinteză scris de H. A. Krebs şi intitulat „Relaţiile de echilibru dintre piridinnucleotide şi adeninnucleotide şi rolul lor în reglarea proceselor metabolice".

Cu excepţia articolelor din primul şi ultimul capitol, celelalte materiale au fost prezentate, ca de obicei, în genul articolelor ştiinţifice, rezultatele fiind amplu analizate şi susţinute prin prezentarea unei bogate bibliografii.

Date fiind renumele binecunoscut al autorilor acestor materiale şi actualitatea subiectelor prezentate, acest volum are o deosebită valoare ştiinţifică.

Dinu Tănăsescu
Institutul de biochimie,
Bucureşti



J. KEUL, E. DOLL, D. KEPPLER, *Muskelstoffwechsel. Die Energiebereitstellung im Skelettmuskel muskel als Grundlage seiner Funktion* (*Metabolismul muscular. Eliberarea de energie în mușchiul scheletic ca bază a funcției sale*), Edit. Barth, München, 1969, 247 p.

Această lucrare, a 9-a dintr-o serie de publicații dedicată activității metabolice musculare, cuprinde 6 capitole, cu un număr total de 16 subcapitole, proporționate cu mult discernămînt în funcție de importanța subiectelor tratate și de materialul bibliografic existent.

Primul capitol este o scurtă introducere istorică a subiectelor celor 5 capitole următoare. În cel de-al 2-lea, „Particularitățile mușchilor roșii și albi", se face o apreciere comparativă a principalelor caracteristici fiziologice, a activității enzimatice și a concentrației celor mai importante componente biochimice din cele două tipuri de mușchi.

În capitolul al 3-lea, „Depozitul energetic al celulei musculare și eliberarea neoxidativă a energiei", împărțit în 5 subcapitole, se trec în revistă date recente referitoare la participarea principalelor macroergice musculare, electroliți, glicogen, glucoză, și, implicit, a glicolizei la metabolismul energetic muscular.

Cel mai amplu și discutat este capitolul al 4-lea, „Eliberarea oxidativă a energiei", subdivizat în 6 subcapitole. Se tratează, în ordine, despre transportul și schimbul gazelor, echilibrul acidobazic, participarea glucidelor, lipidelor, aminoacizilor și a diverselor substrate la eliberarea oxidativă a energiei. Sînt comentate, în special, particularitățile activității musculare de efort.

Ultimele două capitole, „Hipoxia și eliberarea de energie" și „Adaptarea produsului de energie în mușchi în cursul activității corporale", completează imaginea principalelor procese energetice care au loc în mușchi în condițiile activității musculare.

Trebuie să remarcăm participarea la redactarea materialelor acestei lucrări, capitolele 2 și 4, a unui cercetător român, Gh. Haralambie, ceea ce denotă recunoașterea pe plan internațional a valorii biochimiștilor noștri.

Considerăm că această lucrare, bazată pe un număr foarte mare de indicații bibliografice și scrisă de autori cu o bogată experiență, aduce un aport deosebit la cunoașterea proceselor metabolice musculare.

Dinu Tănăsescu
Institutul de biochimie,
București

H. THOENEN, *Bildung und funktionelle bedeutung adrenerger Ersatztransmitter*, Bd. 27 der Reihe *Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik* (*Formarea și importanța funcțională a înlocuitorilor de mediatori adrenergici*, vol. 27 din seria *Medicină, patologie și clinică experimentală*), Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1969, 86 p., 31 fig.

Înlocuirea noradrenalinei prin așa-numiții mediatori falși sau de înlocuire prezintă una din posibilitățile de influențare a transmisiei adrenergice postganglionare. Ea prezintă un interes deosebit, deoarece permite atît realizarea unor modificări cantitative, cît și calitative ale funcției sistemului nervos simpatic și poate duce la noi modele de acțiune farmacologică.

Bazat pe o vastă bibliografie (376 de indicaţii bibliografice) şi pe o bogată experienţă proprie, autorul prezintă în lucrarea de faţă rezultatele diferitelor cercetări experimentale şi perspectivele folosirii practice, în scopuri terapeutice, a înlocuitorilor de mediatori adrenergici.

Se poate obţine, de pildă, formarea de înlocuitori de mediatori prin introducerea unor precursori metabolici falşi în sistemul de sinteză a noradrenalinei, care suferă o transformare enzimatică identică sau similară cu cea a precursorilor fiziologici normali ai noradrenalinei şi care vor fi acumulaţi în locul noradrenalinei la nivelul veziculelor terminaţiilor nervilor simpatici şi eliberaţi apoi ca mediatori. Cercetările au fost efectuate cu ajutorul α-metildopei şi 5-hidroxidopei, care suferă în organism aceleaşi transformări ca şi precursorul fiziologic al noradrenalinei, cunoscut sub denumirea de dopa.

Aplicarea terapeutică a acestor înlocuitori ai mediatorilor este indicată din punct de vedere teoretic ori de cîte ori efectul terapeutic rezultă prin influenţarea mecanismelor adrenergice periferice şi/sau centrale.

Numeroase figuri, tabele, mecanisme de reacţie şi un index alfabetic pe subiecte îmbogăţesc în mod util materialul prezentat.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie,
Bucureşti

* * * *Evolutionary Biochemistry of Proteins* (*Evoluţia biochimică a proteinelor*), sub red. ROBERT E. FEENEY, R. G. ALLISON, Wiley-Interscience, New York—Londra, 1969, 290 p.

Progresele remarcabile realizate în ultimul deceniu în domeniul biochimiei comparate au conturat unele concepţii noi asupra organizării şi evoluţiei biochimice a lumii vii. Preocupările actuale şi tendinţele biochimiei comparate se conturează cu predilecţie asupra bazelor moleculare ale evoluţiei, asupra corelării şi confruntării evoluţiei moleculare cu cea biologică. Evoluţia biochimică, precum şi filogenia moleculelor constituie concepte moderne ale biochimiei comparate şi implică accepţia evoluţiei la nivel molecular.

În acest context se înscrie şi foarte recent apăruta lucrare *Evoluţia biochimică a proteinelor*. Structura cărţii, selecţionarea şi tratarea problemei în speţă sînt astfel concepute de către prestigioşii săi autori, încît reflectă, ca trăsătură definitorie, ideea evoluţiei biochimice, iar datele experimentale şi comentarea lor aduc dovezi peremptorii despre evoluţia moleculară a proteinelor. O caracteristică a cărţii o reprezintă, totodată, ideea utilizării biochimiei comparate pentru studiul funcţiei moleculelor omologe şi analoge. Este prima carte de acest gen care tratează interrelaţiile structurale ale proteinelor, precum şi aspectele lor evolutive şi taxonomice.

Lucrarea abordează studiul comparativ al anumitor grupe de proteine, şi anume cele din plasma sanguină, din lapte şi ou, selectate pe baza relaţiilor lor biosintetice şi de compoziţie. În cadrul acestor grupe de proteine, în lucrare se abordează şi studiul comparativ al unor tipuri de proteine ca transferinele, lizozimii şi inhibitorii enzimelor proteolitice. Fiecare dintre acestea există în toate cele trei surse menţionate, dar manifestă proprietăţi biochimice diferite, precum şi relaţii evolutive diferite. Unul din motivele alegerii şi tratării acestor tipuri

de proteine cu subiect de biochimie comparată este şi faptul că ele au evoluat pe căi diferite, în conservatismul lor surprinzîndu-se variaţii în cursul evoluţiei la nivelul structurii primare.

Materialul expus în această lucrare este ilustrat printr-o bogată şi variată iconografie şi se sprijină pe aproape 600 de indicaţii bibliografice. Cartea se remarcă printr-o sistematizată şi erudită expunere, precum şi printr-un stil clar şi fluent, calităţi care, alături de conţinutul ei, îi conferă un larg interes, constituind o utilă şi plăcută lectură ştiinţifică.

M. Şerban
Institutul de biochimie,
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1970 OKT 1 6

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25 × 17,50, 375 p. + 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie** 1966, 25 × 17, 50, 285 p., 18 pl. legat, anvelopă 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue ,,Studii şi cercetări de biochimie'' paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF.25 — DM.20 — Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Calea Victoriei 126, Boîte postale 134 — 135, Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 13, NR. 3, P. 215—326, BUCUREŞTI, SEPTEMBRIE, 1970

I. P. ,,Informaţia'' — c. 5509

43816

Lei 20. —

E. 1330

04

studii și cercetări de biochimie

4

TOMUL 13

1970

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 13, nr. 4, p. 327—436 București, decembrie, 1970

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.
Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea de comerț exterior-LIBRI, Căsuța poștală 134—135 (Calea Victoriei 126), București România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, str. Docenților nr. 20
Sectorul 1

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 13, nr. 4 1970

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Teoria biostructurală a undelor electroencefalografice 331
D. COTARIU, Izoenzimele izocitrat dehidrogenazei şi glutamat dehidrogenazei din muşchii striaţi la diferite vertebrate 347
A. CSONTOS, Relaţii între activitatea catalazei sanguine şi metabolizarea etanolului în organism 353
L. DUMITRAŞ, E. GROU, I. HURHIŞIU, Modificări biochimice produse în plantele de grîu infectate cu *Tilletia controversa* 357
V. GHEŢIE, C. MOTAŞ, Hidroliza enzimatică a fragmentului Fab din imunoglobulina G de iepure realizată cu o fracţiune subcelulară bogată în catepsine, izolată din ficatul de şobolan 365
E. ILIESCU, Studiul biochimic al hibrizilor. II. Compoziţia chimică a fructelor de măr „Frumos de Voineşti", comparativ cu genitorii 375
V. KOVÁCS, Aspectele metabolismului metioninei S ^{35} şi selenometioninei Se ^{75} la şobolani. II. Studiul comparativ al captării şi încorporării metioninei S ^{35} şi selenometioninei Se ^{75} la şobolani albi, iradiaţi cu raze X 381
TR. C. LAZAR, Efectul inhibitor al urocromului şi extractului apos de ficat asupra iodurării enzimatice a tirozinei-^{14}C şi a tiroglobulinei cu peroxidază tiroidiană şi H_2O_2 *in vitro* 389
N. MOLDOVEANU, C. MEDEŞAN, Activitatea miokinazei şi a creatinkinazei în muşchii perfuzaţi cu 2,4-dinitrofenol 399
G. NEAMŢU, C. BODEA, Cercetări chemotaxonomice la plantele superioare. IV. Pigmenţii carotinoidici din plante semiparazite 405
C. RĂDULESCU, Metabolismul oxidativ al leucocitelor periferice şi rejectarea grefei alogenice de rinichi 411
M. ŞERBAN, D. COTARIU, Biochimia comparată a izoenzimelor. X. Proteinele solubile din creier în filogenie şi localizarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei, aldolazei, malat dehidrogenazei şi aspartat aminotransferazei . . 417
V. TĂMAŞ, GH. SĂLĂJAN, C. BODEA, Efectul polenului de porumb din hrana găinilor asupra pigmentaţiei gălbenuşului de ou 423

RECENZII 431

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tome 13, no. 4 1970

CONTENTS

Page

E. MASCOVSCHI, The biostructural theory of electroencephalographic waves 331
D. COTARIU, Isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase isoenzymes in skeletal muscles of different vertebrates. 347
A. CSONTOS, Relationships between blood catalase activity and ethanol metabolism in the body 353
L. DUMITRAŞ, E. GROU, I. HURGHIŞIU, Biochemical modifications induced in wheat plants infected with *Tilletia controversa* 357
V. GHEŢIE, C. MOTAŞ, Enzymatic breakdown of *Fab* fragment in rabbit immunoglobulin *G* by a cathepsin-rich subcellular fraction isolated from rat liver 365
E. ILIESCU, The biochemical study of hybrids. II. Chemical composition of fruits of apple hybrid ,,Frumos de Voineşti'', as compared to parents . 375
V. KOVÁCS, Some aspects of the metabolism of ^{35}S-methionine and ^{75}Se-selenomethionine in white rats. II. Comparative study of the uptake and incorporation of ^{35}S-methionine and ^{75}Se-selenomethionine in white rats X-ray irradiated 381
TR. C. LAZĂR, Inhibitory effect of the urochrome and aqueous liver extract on enzymatic iodination of tyrosine-^{14}C and thyroglobluin with thyroid peroxidase and H_2O_2 *in vitro* 389
N. MOLDOVEANU, C. MEDEŞAN, Myokinase and creatinkinase activites in muscles perfused with 2,4-dinitrophenol 399
G. NEAMŢU, C. BODEA, Chemotaxonomic studies on higher plants. IV. Carotinoid pigments of semi-parasitic plants 405
C. RĂDULESCU, The oxidative metabolism of peripheral leucocites and the rejection of kidney allografts. 411
M. ŞERBAN, D. COTARIU, Comparative biochemistry of isoenzymes. X. Brain soluble proteins in phylogeny and the localization of lactate dehydrogenase, aldolase, malate dehydrogenase and aspartate aminotransferase isoenzymes. 417
V. TĂMAŞ, GH. SĂLĂJAN, C. BODEA, Effect of corn pollen in hen food on pigmentation of egg yolk. 423

BOOK REVIEWS 431

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 331 – 346 (1970)

TEORIA BIOSTRUCTURALĂ A UNDELOR ELECTROENCEFALOGRAFICE

EUGEN MACOVSCHI

Rezumat. — La baza teoriei biostructurale a undelor electroencefalografice stau următoarele premise, deduse din însușirile cunoscute ale biostructurii : biostructura se poate destrăma parțial punînd în libertate apă, ioni și alte substanțe ; destrămarea parțială a biostructurii este reversibilă ; refacerea biostructurii parțial destrămate necesită un consum de energie biochimică. În sprijinul acestor premise au fost aduse unele argumente experimentale, rezultate din examinarea în lumina concepției biostructurale atît a efluxului sodiului radioactiv din axonii giganți de Sepia, cît și a compoziției sucurilor stoarse în anumite condiții din frunzele de porumb și de varză.

Printre fenomenele care intervin în producerea undelor electroencefalografice au fost examinate: eliberarea și apoi integrarea în biostructură a ionilor, apei și altor substanțe ; schimbul de ioni și apă între soluția intracelulară și mediul extracelular ; influența acestui schimb asupra polarizării membranei celulare și asupra concentrației soluției intracelulare ; activitatea mecanismului de autoreglare care, consumînd energia biochimică, asigură refacerea biostructurii după ce destrămarea ei parțială a atins un anumit prag. Desfășurarea periodică a acestor fenomene, dintre care unele sînt antagoniste, duce la variația periodică a concentrației ionilor în soluția intracelulară, care la rîndul ei determină variația potențialului bioelectric celular și apariția undelor electroencefalografice. Traseul acestor unde depinde atît de modul de desfășurare și de intensitatea fiecăruia dintre fenomenele amintite, cît și de starea biostructurii însăși. Impulsurile rezultate din activitatea receptorilor și a sistemului nervos ca atare, acționînd asupra biostructurii pot de asemenea provoca modificări în traseul ritmului electroencefalografic.

Frecvența undelor electroencefalografice este condiționată de frecvența pulsațiilor biostructurii, amplitudinea acestor unde depinde de variația concentrației ionilor în soluția intracelulară în raport cu aceea a mediului extracelular iar mărimea acestor doi parametri este determinată de grosimea stratului biostructural care se destramă și se reface cu ocazia fiecărei pulsații.

Considerațiile de mai sus au permis explicarea aspectului bifazic al undelor electroencefalografice, dependența amplitudinei acestor unde de frevcența lor, apariția fusurilor în traseurile ritmurilor electroencefalografice și blocarea acestor ritmuri sub acțiunea prelungită a stimulilor senzoriali.

În tratatul de fiziologie medicală și biofizică, elaborat de Ruch și Fulton se face următoarea afirmație cu privire la activitatea electrică a elementelor celulare din creier : „Țesutul cortical prezintă atît o alternanță ritmică continuă a potențialului electric, cît și o varietate de răspunsuri localizate, cu voltaj mare, consecutive activității receptorilor.

Primul ritm se numește „spontan", deoarece originea sa este necunoscută; al doilea tip de răspunsuri se numesc „evocate", deoarece ele sînt asociate cu aportul sensorial" ([1], p. 612). În volumul de electroencefalografie și electromiografie de Călcăianu și Stoica se afirmă că „activitatea bioelectrică cerebrală, obiectivată sub forma unor ritmuri, constituie o problemă încă nelămurită din punct de vedere teoretic" ([2], p. 10). În *Introducere în encefalografie*, Niebeling arată de asemenea că „ ... între fiziologi nu există o unitate de vederi cu privire la cauzele variațiilor potențialului cortical. Această enigmă nici pînă azi nu a fost rezolvată. Chiar și acum toate cunoștințele și descoperirile noastre se bazează pe constatări empirice" ([3], p. 6). Afirmații asemănătoare, din care rezultă că problema originii ritmului spontan a rămas încă nerezolvată, se găsesc în toate cărțile și tratatele din domeniul electroencefalografiei.

Această situație se datorește faptului că dintre diferitele teorii elaborate pînă acum pentru explicarea genezei undelor electroencefalografice (teoria chimică, teoria glială, teoria autoritmicității, teoria circuitelor reverberante, teoria electrică și altele), toate bazate pe concepția moleculară despre alcătuirea materiei vii, „nici una nu a reușit să elucideze în mod satisfăcător numeroase aspecte contradictorii rezultate din examinarea modului de apariție a undelor bioelectrice" ([4], p. 148).

În cursul ultimului deceniu s-a cristalizat o nouă concepție despre alcătuirea materiei vii, profund și principial deosebită de concepția moleculară. Conform acestei concepții noi, protoplasma vie se deosebește de protoplasma moartă prin aceea că o parte din materia ei este integrată într-o structură cu totul specială, purtătoare a însușirilor viului, numită *biostructură* [5]. Se pune deci întrebarea dacă nu cumva această concepție ar putea duce la explicarea originii ritmurilor bioelectrice cerebrale, prin conturarea unei teorii biostructurale a undelor electroencefalografice.

PREMISELE TEORIEI BIOSTRUCTURALE A UNDELOR ELECTROENCEFALOGRAFICE

De la început atrage atenția faptul că numai organismele vii manifestă „ritmul spontan"; o dată cu moartea, activitatea electrică a celulelor încetează. Or, conform concepției biostructurale, tipul particular de structură caracteristic viului — biostructura — nu există decît în protoplasma celulelor vii; o dată cu moartea, această structură se destramă iar componentele pînă atunci integrate în ea (proteine, acizi nucleici, enzime, ioni, apă și altele) sînt puse în libertate; astfel manifestarea însușirilor biostructurii încetează. Concluzia: ritmul spontan depinde, probabil, de biostructura existentă în protoplasma celulelor vii ale creierului.

Pentru a înțelege în ce anume ar putea consta dependența „ritmului spontan" de biostructură, este necesar să luăm în considerare că biostructura se deosebește calitativ de orice structură moleculară, polimoleculară sau supramoleculară pe care ar putea-o forma materia nevie. Ea este o structură biologică, bazată pe cea chimico-fizică și în ea se reflectă stadiul superior, biologic, de dezvoltare a materiei. Biostructura este un sistem prin excelență dinamic, în sensul că în cuprinsul ei au loc, concomitent, pe de o parte un proces de eliberare a componentelor

integrate în ea, deci un proces de destrămare, iar pe de alta un proces de refacere, de reintegrare a componentelor astfel eliberate. Ea își menține integritatea datorită mecanismelor de autoreglare de care dispune și care acționează consumînd energia biochimică. În protoplasma vie materia biostructurată coexistă cu materie neintegrată în biostructură, alcătuită din apă liberă și din substanțele dizolvate în această apă (soluția intrarcelulară). Raporturile spațiale dintre materia biostructurată și soluția intracelulară pot fi asemuite cu cele dintre masa poroasă a unui burete și apa cuprinsă în spațiile capilare, anastomozate, ale acestuia. Reacțiile biochimice din soluția intracelulară constituie biochimismul celulelor, iar integrarea substanțelor în biostructură (asimilația), desprinderea lor din biostructură (desasimilația) și transformările de ordin chimic care se produc în materia biostructurată constituie metabolismul celular [5].

Particularitățile menționate ale biostructurii permit intuirea următoarelor fenomene care se pot produce în protoplasma vie.

Să admitem că biostructura unor celule începe să se destrame, cu punerea în libertate a unor cantități din substanțele pînă atunci integrate în ea (apă, ioni etc) Fenomenul acesta poate provoca modificarea progresivă a concentrației ionilor în apa liberă celulară, și, deci, modificarea progresivă a potențialului biolectric celular. Cînd această destrămare parțială atinge un anumit prag, se pun în acțiune mecanismele de autoreglare datorită cărora se produce reintegrarea în biostructură a componentelor eliberate. Procesul acesta necesită un consum de energie biochimică, și face ca atît concentrația ionilor în apa liberă cît și potențialul bioelectric celular să revină progresiv la valorile lor inițiale. După fenomenul refacerii biostructurii reîncepe fenomenul destrămării. Astfel se produc variațiile periodice ale concentrației ionilor în soluția intracelulară și, deci, variațiile periodice ale potențialului bioelectric care condiționează apariția undelor electroencefalografice. Succesiunea celor două fenomene reprezintă un fel de pulsație a biostructurii, al cărei ritm și intensitate depind de diferiți factori, inclusiv de starea funcțională a materiei biostructurate.

Dacă pulsațiile biostructurii sînt acelea care generează variația potențialului bioelectric al creierului, înseamnă că electroencefalogramele oglindesc ritmul, intensitatea și alte particularități ale acestor pulsații. Prin urmare, cercetarea electroencefalogramelor poate furniza informații cu privire la unele comportări ale biostructurii din celulele creierului, atît în stare normală cît și în diferite stări anormale, provocate experimental sau patologice.

Astfel se conturează o teorie biostructurală a undelor electroencefalografice, bazată pe următoarele premise :

1) biostructura se poate destrăma parțial, punînd în libertate ioni, apă și alte substanțe ;

2) destrămarea parțială a biostructurii este reversibilă ;

3) refacerea biostructurii parțial destrămate necesită un consum de energie biochimică.

În sprijinul acestor premise se pot aduce de pe acum unele argumente teoretice și experimentale.

Destrămarea parțială a biostructurii. În sprijinul premisei că biostructura se poate destrăma parțial pledează constatarea că în anumite împrejurări, de exemplu sub acțiunea dozelor neletale ale inhibitorilor metabolici, țesuturile vii devin mai bogate în apă liberă și în substanțe hidrosolubile decît țesuturile martor. Conform concepției biostructurale, acest surplus de apă liberă și de alte substanțe provine din destrămarea parțială a biostructurii.

Spre exemplificare pot fi amintite rezultatele cercetărilor noastre efectuate pe frunzele plantelor de porumb [5]. Prin tratarea acestor frunze cu 2,4-dinitrofenol în doze mici, proporția apei libere din ele crește cu 60%, a ionilor de potasiu cu 108% și a ionilor de calciu cu 145%, pe cînd în cazul omorîrii frunzelor prin înghețare, deci în cazul destrămării totale a biostructurii lor, apa liberă crește cu 154%, ionii de potasiu cu 429%, iar cei de calciu cu 292%. Înseamnă că sub acțiunea dozelor nemortale ale 2,4-dinitrofenolului biostructura țesutului foliar de porumb se destramă parțial. (Calculul a fost efectuat pe baza mediilor datelor experimentale din primele trei rînduri ale tabelelor 42 și 43 din „Biostructura" [5], pp. 239, 240).

La aceeași concluzie duce și examinarea de pe pozițiile teoriei biostructurii a rezultatelor experimentale obținute de Hodgkin și Keynes [7] prin cercetarea efluxului ionilor de sodiu radioactiv din axonii giganți de Sepia, mai întîi încărcați cu acești ioni și apoi tratați cu 2,4-dinitrofenol sau alți inhibitori metabolici. S-a constatat că sub influența acestor inhibitori efluxul menționat scade. Reexaminînd aceste rezultate experimentale în lumina concepției biostructurale, se ajunge la concluzia că această scădere a efluxului de ioni de sodiu se explică prin micșorarea concentrației lor în apă liberă a axoplasmei, iar calculele arată că pe cînd, înainte de tratarea cu 2,4-dinitrofenol, din 1000 ml apă totală conținută în axoplasmă, 917,7 ml reprezintă apa biostructurată și legată, iar 82,3 ml apa liberă, după tratarea cu 2,4-dinitrofenol cantitatea de apă liberă crește cu 14,8 ml, concentrația ionilor de sodiu scăzînd, implicit, de la 586 la 500 mM/l. Cum cei 14,8 ml apă eliberați astfel nu reprezintă decît o mică parte din totalul inițial de 917,7 ml apă biostructurată și legată, înseamnă că, în condițiile în care s-au făcut experiențele respective, 2,4-dinitrofenolul a provocat o destrămare parțială a biostructurii axonului gigant de Sepia. (Calculul a fost făcut pe baza datelor din rîndul 8 al tabelelor 39 și 41 din „Biostructura" [5], pp. 231, 234).

Cele două exemple arată că biostructura se poate destrăma parțial, eliberînd unele cantități de apă și alte substanțe din care este alcătuită.

Reversibilitatea destrămării parțiale a biostructurii. În sprijinul premisei că biostructura parțial destrămată se poate reface pledează de asemenea unele date experimentale.

Ca exemplu poate servi rezultatul cercetărilor noastre cu privire la acțiunea razelor ultraviolete asupra frunzelor vii de varză roșie [9]. Indicele de refracție al sucului stors din frunze imediat după iradiere ($n_D = 1{,}3403$) s-a dovedit a fi mai mare decît al sucului stors după trei ore de la iradiere ($n_D = 1\,3381$). Or, acest din urmă indice este practic egal cu cel al sucului obținut din frunzele martor, neiradiate ($n_D = 1{,}3384$).

(Toţi aceşti indici de refracţie reprezintă mediile valorilor cuprinse în tabela 49 din „Biostructura" [5] p. 251). Conform concepţiei biostructurale, creşterea indicelui de refracţie imediat după iradiere se datoreşte substanţelor hidrosolubile eliberate din biostructura frunzelor, prin destrămarea parţială provocată de razele ultraviolete. Revenirea ulterioară la valoarea iniţială arată reintegrarea acestor substanţe în biostructura din care ele au provenit [9].

La o concluzie similară duc şi rezultatele cercetărilor efectuate de Hodgkin şi Keynes [7], după care efluxul ionilor de sodiu radioactiv din axonii giganţi de Sepia, scăzut prin aplicarea 2,4-dinitrofenolului, revine la normal, după îndepărtarea acestui inhibitor prin spălarea axonilor cu apă de mare. Or, conform concepţiei biostructurale, eliminarea 2,4-dinitrofenolului din axon permite reintegrarea în biostructura axoplasmei a apei ce a fost eliberată sub influenţa acestuia [8]. Astfel, datorită reintegrării în biostructură a celor 14,8 ml‰ apă eliberată, proporţia apei libere din axoplasmă scade la normal, adică la 82,3 ml‰, iar concentraţia ionilor de sodiu creşte revenind practic la nivelul pe care l-ar fi avut dacă 2,4-dinitrofenolul nu era aplicat. Cum fenomenul menţionat duce la „normalizarea" efluxului ionilor de sodiu din axon, înseamnă că destrămarea parţială a biostructurii axonului gigant de Sepia, provocată de 2,4-dinitrofenol este reversibilă. (Calculul a fost efectuat pe baza datelor din rîndul 12 al tabelelor 39 şi 41 din „Biostructură" [5], pp. 231, 234).

Cele două exemple arată că biostructura destrămată parţial se poate reface cu uşurinţă.

Refacerea biostructurii parţial destrămate necesită un consum de energie biochimică. În sprijinul acestei premise se pot aduce unele consideraţii teoretice, bazate pe rezultatele anumitor cercetări experimentale [10], [11], [5] (pp. 57, 58).

În adevăr, din moment ce scăderea producerii de energie biochimică, provocată de inhibitorii metabolici, duce la destrămarea parţială a biostructurii, iar îndepărtarea inhibitorilor permite refacerea biostructurii, se poate admite că această refacere se datoreşte tocmai revenirii la normal a producerii de energie biochimică.

De aici concluzia : refacerea biostructurii parţial destrămate necesită un consum de energie, provenită din biochimismul celular.

Se înţelege că materialul teoretic şi experimental prezentat aici sprijină direct cele trei premise pe care se bazează teoria biostructurală a undelor electroencefalografice. Teoria însăşi este sprijinită însă numai indirect, întrucît cercetările respective au fost efectuate nu pe creier, ci pe alt material biologic şi în alte condiţii decît acelea în care funcţionează creierul.

O dată precizată ideea că undele electroencefalografice se datoresc pulsaţiilor biostructurii celulelor din creier şi oglindesc fenomenele care se produc la nivelul acestei structuri, se poate trece la dezvoltarea teoriei biostructurale a acestor unde, ţinînd seama că orice teorie în acest domeniu trebuie :

— să indice acele fenomene care intervin în producerea undelor electroencefalografice şi influenţează traseul lor,

— să explice fenomenele descoperite empiric prin practica electroencefalografiei, cum sînt, de exemplu: relaţiile dintre amplitudinea şi frecvenţa undelor electroencefalografice, apariţia fusurilor în ritmurile undelor electroencefalografice şi blocarea ritmurilor electroencefalografice.

FENOMENE GENERATOARE DE UNDE ELECTROENCEFALOGRAFICE

Printre fenomenele care intervin în producerea undelor electroencefalografice, unele se manifestă în cursul fazelor de destrămare parţială şi de refacere a biostructurii, iar altele se desfăşoară sub influenţa impulsurilor nervoase datorite fie activităţii receptorilor, fie activităţii sistemului nervos însuşi. De aceea, este necesar să examinăm întîi acele fenomene care se produc la nivelul biostructurii, atît în faza destrămării ei parţiale cît şi în faza refacerii, apoi să stabilim cum aceste fenomene conturează traseul undelor electroencefalografice şi, în fine, să precizăm fenomenele ce se desfăşoară la nivelul biostructurii, sub influenţa impulsurilor de diferite provenienţe.

Faza destrămării parţiale a biostructurii. În această fază, fenomenul principal constă în eliberarea de ioni, apă şi alte substanţe, care se adaugă la soluţia intracelualră, adică la apa liberă celulară, care şi ea conţine anumiţi ioni. Dar fenomenul acesta numai atunci poate duce la modificarea concentraţiei ionilor în soluţia intracelulară şi la modificarea potenţialului bioelectric, dacă proporţia dintre apa şi ionii care se eliberează din materia biostructurată diferă de proporţia în care aceste substanţe se găsesc în soluţia intracelulară. Posibilitatea realizării acestei condiţii în celulele creierului este, principial, demonstrată de faptul că sub acţiunea 2,4-dinitrofenolului biostructura frunzelor de porumb eliberează ionii de potasiu şi apă în proporţia de 8,24mg la 9 ml, pe cînd în soluţia intracelulară aceste substanţe se găsesc în proporţia de 8,06 mg la 13 ml. Astfel, în prezenţa 2,4-dinitrofenolului, datorită destrămării parţiale a biostructurii, concentraţia ionilor de potasiu în soluţia intracelulară a frunzelor de porumb creşte cu 12%. (Calculul a fost efectuat pe baza datelor cuprinse în rîndul 1 al tabelelor 42 şi 43 din „Biostructura" [5], pp. 239, 240). Se înţelege că în desfăşurarea fenomenului menţionat un rol important revine distribuţiei neuniforme în biostructură a apei, ionilor şi altor componente, fapt constatat cu ocazia diferitelor cercetări [5] pp. 210, 219, 221), [12]—[14]. Se mai înţelege că modificarea potenţialului bioelectric de care depinde amplitudinea undei electroencefalografice trebuie să fie cu atît mai mare, cu cît concentraţia ionilor din soluţia intracelulară se modifică mai mult în comparaţie cu concentraţia ionilor din mediul extracelular.

Mai departe, se poate intui că creşterea concentraţiei ionilor în soluţia intracelulară provoacă alte două fenomene, care de data aceasta se manifestă la nivelul membranei celulare:

— schimbul de ioni între soluţia intracelulară şi mediul extracelular, fenomen care contribuie la modificarea polarizării membranei,

— trecerea apei din mediul extracelular în soluția intracelulară, fenomen care tinde să micșoreze concentrația ionilor în soluția intracelulară și s-o mărească pe aceea din mediul extracelular.

În fine, se poate admite că datorită destrămării progresive a biostructurii și eliminării din ea a ionilor și apei, starea materiei biostructurate se modifică în așa fel, încît apare tendința tot mai accentuată de revenire la starea inițială, prin reintegrarea în biostructură a apei și ionilor care au fost eliberați. Poate că tocmai această modificare a stării materiei biostructurate stă la baza acelui mecanism autoreglator, cuprins în biostructură, care, intrînd în acțiune în momentul cînd destrămarea acesteia atinge un anumit prag, declanșează procesul de refacere a biostructurii. Or, declanșarea mecanismului menționat reprezintă fenomenul care marchează sfîrșitul fazei de destrămare a biostructurii și începutul fazei de refacere.

Faza de refacere a biostructurii. În această fază fenomenul principal constă în reintegrarea progresivă în biostructură a apei, ionilor și altor substanțe eliberate în decursul fazei precedente. Datorită acestui fenomen, care necesită un consum de energie biochimică, concentrația ionilor din soluția intracelulară scade și, în mod corespunzător, se modifică potențialul bioelectric. Se înțelege că această modificare se produce în sens invers comparativ cu aceea din faza destrămării parțiale. Se înțelege, de asemenea, că scăderea progresivă a concentrației ionilor în soluția intracelulară determină inversarea mersului celor două fenomene care se produc la nivelul membranei celulare : schimbul de ioni și schimbul de apă între soluția intracelulară și mediul exterior.

Conturarea traseului undelor electroencefalografice. O dată făcute aceste precizări, se poate trece la lămurirea dependenței traseului undelor electroencefalografice de jocul fenomenelor menționate. Cum însă jocul acesta depinde de numeroși factori și poate varia în limite largi, se înțelege că procesul care duce la conturarea traseului undelor electroencefalografice poate prezenta aspecte și particularități corespunzătoare. Datorită complexității problemei, ne-am propus s-o examinăm amănunțit într-o altă lucrare, urmînd ca aici să prezentăm numai schematic, spre exemplificare, doar una din variantele posibile. Spre a simplifica deducțiile, vom face abstracție de schimbul de ioni între soluția intracelulară și mediul extracelular, luînd în considerare numai pulsațiile biostructurii și schimbul de apă prin membranele celulare.

Să admitem, deci, că în *prima etapă* (fig. 1.I) biostructura se găsește în plin proces de destrămare eliberînd cantități relativ mari de ioni și de alte substanțe hidrosolubile, dar relativ puțină apă. Astfel are loc o creștere progresivă a concentrației soluției intracelulare, o modificare corespunzătoare a potențialului bicelectric și o accentuare a amplitudinii undei electroencefalografice. Cum fenomenul destrămării parțiale a biostructurii nu durează mult, în curînd concentrația ionilor din soluția intracelulară atinge un maximum, căruia îi corespunde vîrful undei electroencefalografice. Mărimea acestui maxim este însă condiționată nu numai de fenomenul eliberării ionilor din materia biostructurată, ci și de fenomenul trecerii apei prin membrana celulară, deoarece creșterea progre-

sivă a concentrației soluției intracelulare provoacă pătrunderea tot mai intensă, în această soluție, a apei din mediul extracelular, cu care soluția menționată a fost la început în echilibru osmotic. Or, pătrunderea apei tinde să dilueze soluția intracelulară și să micșoreze maximul amintit totodată ea tinde să mărească concentrația ionilor în mediul extracelular. Astfel jocul celor două fenomene conturează traseul ascendent al undei electroencefalografice (mai precis: cea de a doua jumătate a acestui traseu).

După atingerea punctului maxim, începe *a doua etapă* a procesului (fig. 1.II). Datorită faptului că la sfîrșitul etapei precedente concentrația soluției intracelulare a atins un nivel relativ ridicat, această nouă etapă se caracterizează prin pătrunderea continuă, în soluția intracelulară, a apei din mediul extracelular. De aici, diluarea progresivă a soluției intracelulare, scăderea corespunzătoare a potențialului bioelectric și micșorarea amplitudinii undei electroencefalografice, pînă la valorile lor inițiale. Viteza cu care procesul se desfășoară în această etapă este însă condiționată nu numai de fenomenul pătrunderii apei din exterior, ci și de declanșarea fenomenului de reintegrare în biostructură a ionilor și altor substanțe eliberate din ea în etapa precedentă. Or, această reintegrare de ioni și alte substanțe tinde să scadă concentrația soluției intracelulare și deci să încetinească pătrunderea apei din mediul extracelular. Astfel, prin jocul ambelor fenomene se conturează prima jumătate a traseului descedent al undei electroencefalografice.

Fig. 1. — Schema simplificată a succesiunii fenomenelor care se produc în celule de creier datorită pulsațiilor biostructurii. S-au luat în considerare numai schimbările de ioni dintre biostructură și soluția intracelulară precum și schimburile de apă dintre soluția intracelulară și mediul extracelular. Toate valorile cifrice sînt exprimate în unități arbitrare.
a — cantitatea ionilor în soluția intracelulară; *A* — variația cantității ionilor în soluția intracelulară datorită pulsațiilor biostructurii; *b* — cantitatea de apă în soluția intracelulară (respectiv volumul apei); *B* — variația cantității de apă din soluția intraceluară este reprezentată prin lungimea coloanelor; variația concentrației ionilor în soluția intracelulară este indicată prin intensitatea hașurilor (*hașurile încrucișate*: concentrațiile ionilor în soluția intracelulară ce depășesc concentrația în mediul extracelular; *hașurile oblice*: concentrațiile ionilor în soluția intracelulară care sînt sub nivelul concentrației în mediul extracelular; *coloane nehașurate* (albe): concentrația ionilor în soluția intracelulară egală cu cea din mediul extracelular, *c* — concentrația ionilor în soluția intracelulară; *C* — intensitatea și direcția schimburilor de apă dintre soluția intracelulară și mediul extracelular sînt indicate prin lungimea și sensul săgeților; *D* — traseul undei electroencefalografice. I — Fenomene din prima etapă, ce corespunde părții a doua a traseului ascendent al undei electroencefalografice; II — fenomene din etapa a doua, ce corespunde primei părți a traseului descendent al undei electroencefalografice; III — fenomene din etapa a treia, ce corespunde jumătății a doua a traseului descendent al undei electroencefalografice; IV—fenomene din etapa a patra, ce corespunde primei jumătăți ascendente a undei electroencefalografice.

Partea negativă a undei electroencefalografice se află deasupra liniei *OP*, iar partea pozitivă dedesubtul acestei linii. Concentrația medie a ionilor în mediul extracelular a fost admisă ca egală cu 10,0%.

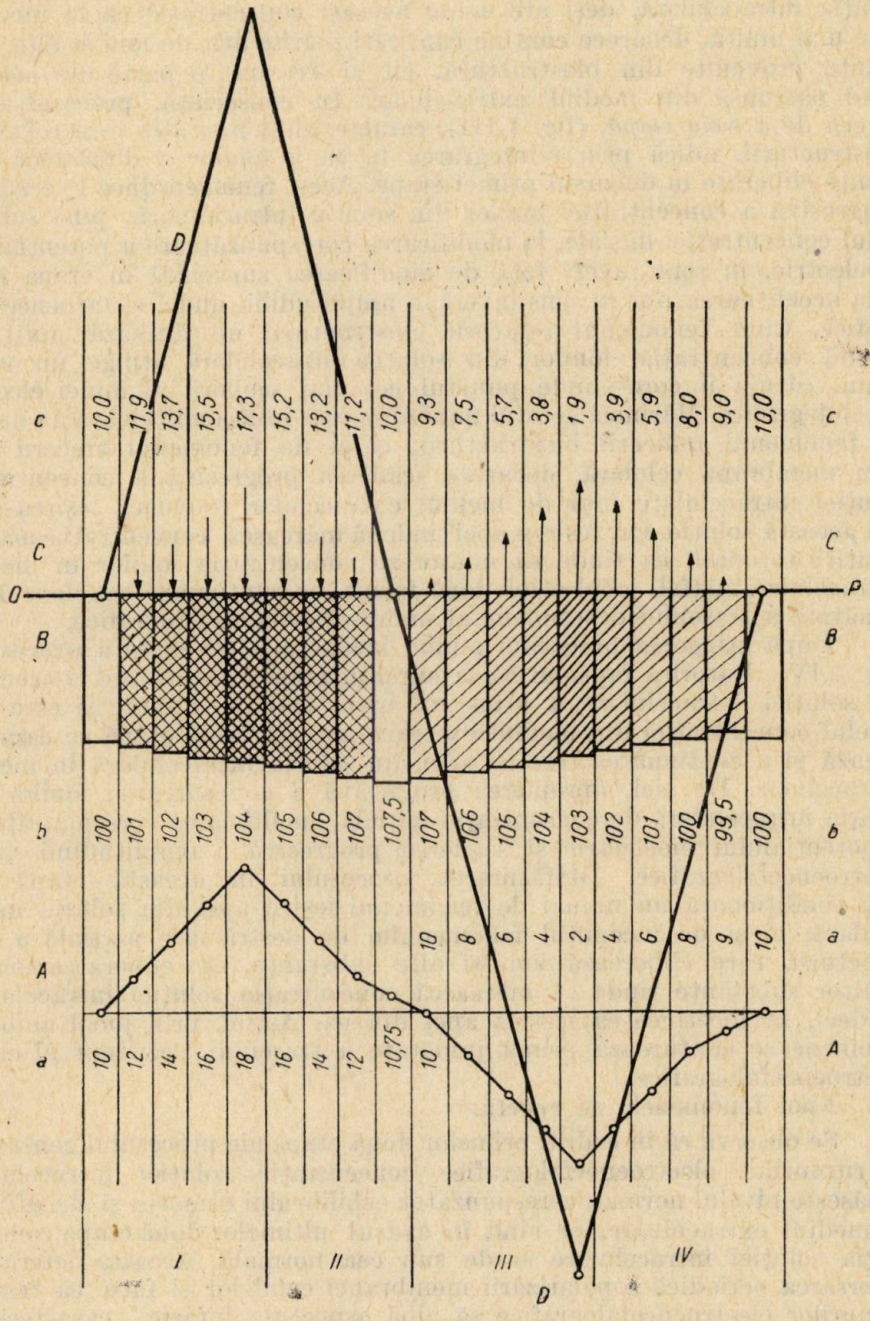

D
c
C
O
P
B
b
A
a
10,0 11,9 13,7 15,5 17,3 15,2 13,2 11,2 10,0 9,3 7,5 5,7 3,8 1,9 3,9 5,9 8,0 9,0 10,0
100 101 102 103 104 105 106 107 107,5 107 106 105 104 103 102 101 100 99,5 100
10 12 14 16 18 16 14 12 10,75 10 8 6 4 2 4 6 8 9 10
I
II
III
IV
D

Fig. 1.

Procesul însă nu se opreşte aici, chiar dacă concentraţia soluţiei intracelulare şi potenţialul bioelectric au revenit la valorile lor iniţiale. Cauza este următoarea: biostructura încă nu s-a refăcut integral, iar soluţia intracelulară, deşi are acum aceeaşi concentraţie ca la început, este mai multă, deoarece conţine cantităţi mărite atît de ioni şi alte substanţe provenite din biostructură, cît şi de apă, o parte din aceasta fiind pătrunsă din mediul extracelular. În consecinţă, procesul intră în cea de *a treia etapă*, (fig. 1.III), caracterizată mai ales prin refacerea biostructurii, adică prin reintegrarea în ea a ionilor şi diferitelor substanţe eliberate în decursul primei etape. Acest fenomen duce la scăderea progresivă a concentraţiei ionilor din soluţia intracelulară, pînă sub nivelul concentraţiei iniţiale, la modificarea corespunzătoare a potenţialului bioelectric, în sens invers faţă de modificarea survenită în etapa întîi, şi la accentuarea, tot în sens invers, a amplitudinii undei electroencefalografice. Cum fenomenul refacerii biostructurii nu durează mult, în curînd concentraţia ionilor din soluţia intracelulară atinge un minimum, căruia îi corespunde punctul cel mai scoborît al undei electroencefalografice. Mărimea acestui minimum este însă condiţionată nu numai de fenomenul refacerii biostructurii, ci şi de fenomenul trecerii apei prin membrana celulară, deoarece scăderea progresivă a concentraţiei soluţiei intracelulare faţă de mediul extracelular provoacă ieşirea apei din această soluţie. Or, ieşirea apei tinde să mărească concentraţia acestei soluţii; totodată ea tinde să micşoreze concentraţia ionilor în mediul extracelular. Astfel, jocul celor două fenomene conturează cea de a doua jumătate a traseului descendent al undei electroencefalografice.

După atingerea punctului minim începe *a patra etapă* a procesului (fig. 1.IV). Datorită faptului că la sfîrşitul etapei precedente concentraţia soluţiei intracelulare a atins un nivel relativ scăzut, şi este sub nivelul concentraţiei din mediul exterior, această nouă etapă se caracterizează prin continuarea trecerii apei din soluţia intracelulară în mediul extracelular. De aici, apropierea progresivă a concentraţiei ionilor din soluţia intracelulară de concentraţia iniţială, modificarea corespunzătoare a potenţialului bioelectric şi scăderea progresivă a amplitudinii undei electroencefalografice. Desfăşurarea procesului în această etapă este însă condiţionată nu numai de fenomenul ieşirii apei din soluţia intracelulară, ci şi de începutul fenomenului de destrămare parţială a biostructurii, care eliberează ioni şi alte substanţe. Or, eliberarea ionilor şi altor substanţe tinde să mărească concentraţia soluţiei intracelulare şi, deci, să încetinească ieşirea apei din ea. Astfel, prin jocul ambelor fenomene se conturează prima jumătate a traseului ascendent al undei electroencefalografice.

Apoi fenomenele se repetă.

Se observă că în cadrul primelor două etape ale procesului generator al ritmurilor electroencefalografice concentraţia soluţiei intracelulare depăşeşte nivelul normal, corespunzător echilibrului osmotic şi de difuzie cu mediul extracelular, pe cînd în cadrul ultimelor două etape concentraţia soluţiei intracelulare scade sub cea normală. Aceasta determină inversarea periodică a polarizării membranei celulelor şi face ca traseul ritmurilor electroencefalografice să aibă aspectul „bifazic", caracteristic succesiunii undelor pozitive-negative.

Se mai constată că fiecare porţiune a traseului undelor electroencefalografice oglindeşte rezultanta ansamblului unor fenomene antagoniste care, datorită pulsaţiilor biostructurii, se produc în protoplasma celulelor creierului şi generează undele respective. De aceea, cercetarea sistematică a aspectului acestor traseuri va putea contribui la descifrarea naturii, succesiunii şi îmbinării fenomenelor menţionate.

De asemenea este de remarcat că desfăşurarea acestor fenomene, precum şi a altora, încă neluate în considerare (ca schimbul de ioni între soluţia intracelulară şi mediul extracelular, modificarea periodică a concentraţiei ionilor în mediul extracelular, modificarea permeabilităţii membranelor celulare în funcţie de starea biostructurii, gradul de polarizare a acestor membrane), care contribuie la generarea ritmurilor electroencefalografice, nu implică decît participarea unor cantităţi neînsemnate de ioni şi de apă, dacă aceste fenomene se produc în imediata vecinătate a membranei celulare. De aceea fenomenele menţionate se pot desfăşura cu viteze mari. [1]

Acţiunea impulsurilor nervoase asupra biostructurii. O dată lămurită, în principiu, dependenţa traseului undelor electroencefalografice de fenomenele care se produc în cursul pulsaţiilor biostructurii, se poate trece la precizarea fenomenelor care se desfăşoară la nivelul biostructurii celulelor din creier sub influenţa impulsurilor nervoase. Natura acestor fenomene poate fi intuită pe baza următorului raţionament.

Numai protoplasma vie prezintă însuşirea excitabilităţii, deoarece numai ea răspunde într-un mod cu totul caracteristic la acţiunea agenţilor excitanţi. După moarte, ca orice formaţiune alcătuită din materie nevie, ea este indiferentă la acţiunea acestor agenţi. Or, conform teoriei noastre, protoplasma vie este alcătuită atît din materie biostructurată cît şi din materie obişnuită, nevie; cum materia nevie nu răspunde la acţiunea agenţilor excitanţi, înseamnă că însuşirea specifică a protoplasmei vii de a răspunde la excitare se datoreşte tocmai materiei biostructurate pe care o conţine. Dacă excitaţiile prea puternice sînt mortale, adică provoacă destrămarea totală şi nereversibilă a biostructurii, este firesc să admitem că sub acţiunea excitărilor slabe, după încetarea cărora celulele revin la starea lor iniţială, biostructura se destramă numai parţial şi reversibil. Vom considera că această destrămare parţială şi reversibilă a biostructurii are loc numai într-o porţiune, într-un strat al ei, pe care îl vom denumi stratul sensitiv sau „stratul S". Este de presupus că grosimea acestui strat S nu este fixă, ci depinde atît de starea biostructurii în momentul excitării cît şi de intensitatea acţiunii agenţilor excitanţi. De altfel, noi am arătat că „datorită legăturilor corelative dintre componentele biostructurii, modificările provocate de agenţii excitanţi în starea unei componente se transmit altor componente şi se repercutează, după caz, fie numai asupra unei porţiuni a biostructurii,

[1] Faptul că ritmul spontan se constată la ţesutul cortical şi nu se constată la alte ţesuturi poate fi explicat în moduri diferite. De exemplu, se poate admite că pulsaţiile biostructurii celulelor din alte ţesuturi sînt relativ slabe şi, de aceea, ritmul spontan nu poate fi pus în evidenţă. Se poate însă admite că pulsaţiile biostructurii din alte ţesuturi sînt la fel de intense, dar că proporţia dintre ioni şi apa care se eliberează şi se integrează în biostructură în cursul pulsaţiilor se apropie atît de mult de aceea din soluţia intracelulară, încît nu provoacă manifestarea unui ritm spontan sesizabil prin mijloacele actuale de investigaţie. Sînt posibile şi alte explicaţii. Viitoarele cercetări experimentale vor lămuri această problemă.

fie chiar asupra biostructurii întregi" [5] (p.176). Dar, dacă modificarea stării unei componente poate influența starea biostructurii, cu atît mai mult eliminarea unui strat întreg, provocată de excitare, nu poate să rămînă fără efect. Ce anume se modifică în comportarea biostructurii în aceste împrejurări, se deduce din faptul cunoscut că, imediat după ce a răspuns la o excitare, materia vie devine neexcitabilă, adică nu mai răspunde unei noi excitări, ori cît de puternică ar fi aceasta (perioada refractară absolută). Înseamnă că o dată ce, în urma unei excitări, biostructura și-a pierdut stratul ei S, ea devine incapabilă să răspundă unor noi excitări. Prin urmare, excitabilitatea biostructurii depinde de existența stratului S. Cum după un anumit timp de la încetarea excitării, excitabilitatea materiei vii începe să se restabilească (perioada refractară relativă), înseamnă că în cursul acestei perioade stratul S al biostructurii se reface progresiv.

Menționăm că problema excitabilității materiei vii, privită din acest punct de vedere, va forma obiectul unei alte lucrări.

Din cele de mai sus rezultă că impulsurile nervoase, acționînd asupra biostructurii, pot produce efecte variate, prin modificarea stării ei și prin destrămarea ei parțială și reversibilă. Desigur, între fenomenele menționate și pulsațiile biostructurii, în cadrul cărora are loc de asemenea o destrămare parțială și reversibilă a biostructurii, există o anumită corelație. De ea trebuie să se țină seama atunci cînd se pune problema explicării diferitelor fenomene cunoscute din practica electroencefalografiei.

BAZELE BIOSTRUCTURALE ALE FENOMENELOR ELECTROENCEFALOGRAFICE

Relațiile dintre amplitudinea și frecvența undelor electroencefalografice. Se știe că între amplitudinea și frecvența undelor electroencefalografice există, în general, o corelație, și anume : „amplitudinea acestor unde este invers proporțională cu frecvența tipică" [1] (p.613). Faptul acesta are o semnificație profundă. El arată că undele electroencefalografice sînt generate de un proces periodic, caracterizat prin aceea că fenomenul care condiționează amplitudinea undelor depinde de fenomenul care condiționează frecvența lor. Or, conform teoriei biostructurale a undelor electroencefalografice, modificarea periodică a concentrației ionilor în soluția intracelulară, care condiționează amplitudinea acestor unde, depinde de pulsațiile biostructurii, care condiționează frecvența lor. Prin urmare, această teorie oglindește corelația menționată, și nu ne rămîne decît să lămurim natura acestei corelații.

În consecință, luăm în considerare că în cursul fiecărei pulsații se destramă și se reface un anumit strat al biostructurii, fenomen ce duce la eliberarea și integrarea periodică de apă, ioni și alte substanțe. Cu cît stratul acesta este mai gros, cu atît timpul necesar destrămării și refacerii lui devine mai lung, frecvența pulsațiilor — deci și a undelor electroencefalografice devine mai mică, iar amplitudinea undelor devine mai mare, deoarece o dată cu creșterea grosimii stratului S crește și cantitatea de ioni ce se eliberează și apoi se reintegrează în biostructură. Și invers : cu cît stratul este mai subțire, cu atît el se destramă și se

reface mai repede, frecvența pulsațiilor biostructurii — și deci a undelor electroencefalografice — crește, iar cantitatea ionilor eliberați și reintegrați devenind mai mică, amplitudinea undelor scade.

Dacă se mai ține seama de faptul că creierul unuia și aceluiași om poate genera unde electroencefalografice diferite, a căror frecvență și amplitudine depind de starea lui funcțională, se poate deduce că grosimea stratului de biostructură, care se destramă și se reface în decursul fiecărei pulsații, variază în funcție de starea biostructurii [2].

În cazul unei stări de relaxare a activității creierului, pulsațiile biostructurii devenind mai lente, permit destrămarea parțială și reversibilă a unui strat mai gros al acestei structuri. De aceea, în aceste împrejurări apar unde electroencefalografice cu frecvență mică și amplitudine mare (ritmul alfa). În schimb, în cazul stării de tonus sporit, corespunzătoare unei activități funcționale intense a creierului, pulsațiile biostructurii fiind mai rapide, fac ca stratul care se destramă să fie relativ subțire. De aceea, în aceste împrejurări undele electroencefalografice sînt de frecvență mare și amplitudine relativ mică (ritmul beta).

Apariția fusurilor în secvențele undelor electroencefalografice. Apariția fusurilor caractrizate prin creșterea și scăderea progresivă și periodică a amplitudinii undelor electroencefalografice, neînsoțită de o modificare corespunzătoare a frecvenței, pare a fi în discordanță cu regula dependenței amplitudinii de frecvență. Această discordanță apare însă numai în cazul cînd considerăm că atît amplitudinea cît și frecvența undelor electroencefalografice sînt determinate de pulsațiile unei singure biostructuri a creierului. Or, substanța cenușie cuprinde două categorii principale de celule, deosebite ca aspect morfologic și ca rol funcțional: celule neuronale și celule gliale. Conform concepției biostructurale, acestor două categorii de celule le corespund biostructuri puțin diferite, deoarece celulele adaptate la funcții diferite se deosebesc prin biostructura lor [15]. Coexistența celulelor diferite într-unul și același țesut, influențele lor reciproce și adaptarea lor la același ritm funcțional, fac ca pulsațiile biostructurilor lor să fie în general sincrone. Ajunge însă intervenția unui factor la care biostructurile celulelor respective răspund într-un mod nu tocmai identic, pentru ca sincronismul pulsațiilor să fie dereglat. Aceasta duce la manifestarea fenomenului bătăilor și, deci, la apariția periodică a fusurilor în succesiunea undelor electroencefalografice.

Un fenomen asemănător se poate produce și prin dereglarea sincronismului pulsațiilor biostructurii la celule de același fel, dacă numai unele din ele răspund la acțiunea unui factor perturbător.

Rezultă că prin cercetarea condițiilor în care apar fusurile în electroencefalograme s-ar putea obține unele informații cu privire la eventualele deosebiri dintre frecvențele pulsațiilor din celulele neuronale și din

[2] Această concluzie concordă cu unele prevederi ale concepției biostructurale, după care la destrămarea parțială și reversibilă a biostructurii „și la modul cum se produce ea, contribuie așezarea neuniformă a componentelor biostructurii și repartiția neuniformă a forțelor care leagă componentele respective. De aici, existența în biostructură a unor linii de „clivaj," unele mai rezistente, iar altele mai puțin rezistente și deci susceptibile de a se desface mai ușor [15] ... Important este ... că situația liniilor de „clivaj" nu este fixă, ci se schimbă în funcție de starea și condițiile de existență ale biostructurii" [5] (p. 69).

cele gliale, precum şi la factorii care provoacă dereglarea sincronismului acestor pulsaţii. În orice caz, faptul bine cunoscut că fusurile apar mai ales la undele electroencefalografice de joasă frecvenţă (ritmurile alfa, ritmurile stadiului C al somnului, ritmurile la animalele tratate cu barbiturice, ritmurile cu declanşări spontane în cazurile de anestezie etc.) arată că scăderea tonusului funcţional şi trecerea creierului în stare de relaxare este favorabilă dereglării sincronismului pulsaţiilor biostructurilor neuronale şi gliale.

Blocarea ritmurilor electroencefalografice. Blocarea ritmurilor electroencefalografice prin stimuli luminoşi, sonori, tactili etc. pune problema fenomenelor care se produc în acele celule ale creierului asupra cărora acţionează impulsurile provocate de stimuli. Or, faptul că aceste fenomene sînt însoţite de modificarea amplitudinii şi frecvenţei undelor electroencefalografice arată că impulsurile nervoase pot produce modificări la nivelul acelui strat al biostructurii, care se destramă în cadrul pulsaţiilor.

Dacă stimulul acţionează continuu, atunci, pe toată durata acţiunii lui, o parte din acel strat este menţinută în stare de destrămare. Înseamnă că în acest caz pulsaţiile biostructurii se fac numai pe socoteala părţii restante, acum mai subţire, a stratului menţionat, ceea ce face ca frecvenţa pulsaţiilor să crească, iar cantitatea ionilor care se eliberează din biostructură şi se reintegrează în ea cu ocazia fiecărei pulsaţii să devină mai mică. Consecinţa : creşterea frecvenţei şi scăderea amplitudinii undelor electroencefalografice. După încetarea acţiunii stimulului, stratul destrămat se reface şi revine, deci, la grosimea sa iniţială ; prin urmare, frecvenţa şi amplitudinea undelor electroencefalografice revin şi ele la mărimea pe care au avut-o înainte de intervenţia stimulului respectiv. Astfel poate fi explicată blocarea ritmului alfa prin stimulii luminoşi sau psihici, precum şi blocarea ritmului beta sub acţiunea excitaţiilor tactile.

CONCLUZII

În lumina concepţiei biostructurale despre alcătuirea materiei vii, undele electroencefalografice se datoresc pulsaţiilor biostructurii din protoplasma celulelor creierului, adică succesiunii periodice a fenomenelor de destrămare parţială şi de refacere a acestei structuri.

Undele electroencefalografice apar prin jocul următoarelor fenomene care se produc la nivelul biostructurii şi membranelor celulelor din creier : eliberarea din biostructură a ionilor, a apei şi a altor substanţe, urmată de reintegrarea acestora în biostructură ; schimbul de ioni şi apă între soluţia intracelulară şi mediul extracelular ; variaţia periodică a polarizării membranelor celulare şi a concentraţiei ionilor în soluţia intracelulară şi în mediul extracelular ; activitatea mecanismului de reglare care, consumînd energie biochimică, asigură refacerea biostructurii după ce destrămarea ei parţială a atins un anumit prag.

Frecvenţa undelor electroencefalografice este condiţionată de frecvenţa pulsaţiilor biostructurii, iar amplitudinea lor depinde de variaţia

concentrației ionilor în soluția intracelulară, în raport cu mediul extracelular.

Aspectul bifazic al undelor electroencefalografice, caracteristic succesiunii undelor pozitivo-negative, se datorește împrejurării că în cadrul unora din etapele procesului generator al acestor unde concentrația ionilor din soluția intracelulară depășește, iar în cadrul altor etape scade sub concentrația ionilor din mediul extracelular.

Fenomenele generatoare de unde electroencefalografice se pot desfășura rapid, deoarece nu implică decît participarea unor cantități neînsemnate de ioni și apă, în cazul cînd se produc în imediata vecinătate a membranelor celulare.

Relațiile dintre amplitudinea și frecvența undelor electoencefalografice sînt condiționate, pe de o parte, de grosimea stratului biostructural care se destramă și se reface în cadrul fiecărei pulsații, iar pe de altă parte de starea biostructurii.

Apariția fusurilor în secvențele undelor electroencefalografice depinde de o anumită dereglare a sincronismului pulsațiilor biostructurii celulelor neuronale, în raport cu pulsațiile biostructurii celulelor gliale. Același fenomen poate fi datorit și dereglării pulsațiilor biostructurii unor celule de același fel, atunci cînd numai o parte din acestea sînt supuse acțiunii factorilor susceptibili să provoace o astfel de dereglare.

Blocarea ritmurilor electroencefalografice prin stimulii sensoriali se datorește destrămării parțiale a stratului sensitiv al biostructurii, provocată de impulsuri generate de stimuli prin intermediul receptorilor corespunzători.

Prezentat la redacție la 15 iulie 1970

Institutul de biochimie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. T.C. Ruch, J. F. Fulton *Fiziologie medicală și biofizică*, Edit. medicală, București, 1963.
2. G. Călcăianu, I. Stoica, *Electroencefalografie și electromiografie*, Edit. medicală, București, 1963.
3. H. G. Niebeling, *Einführung in die Elektroenzephalographie*, I. A. Barth, Leipzig, 1968.
4. R. Floru, M. Steriade, *Veghea și somnul* (Enciclopedia de buzunar), Edit. științifică, București, 1967.
5. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei R.S.R., București 1969.
6. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim, **12**, 1, 19 (1969).
7. A. L. Hodgkin R. D. Keynes, J. Physiol., **128**, 28, (1955).
8. E. Macovschi St. cerc. biochim., **11**, 3, 213 (1968).
9. E. Macovschi, S. Ceaușescu, St. cerc. biochim., **11**, *4*, 331 (1969).
10. E. Macovschi St. cerc. biochim., **8**, *3*, 253 (1965); Rev. roum. biochim., **2**, *3*, 189 (1965).
11. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **8**, *4*, 371 (1965); Rev. roum biochim., **2**, *4*, 285 (1965).
12. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. biochim., **5**, *4*, 257 (1968).
13. E. Macovschi, V. Fruvzeti, Rev. roum biochim., **5**, *3*, 165 (1968).
14. E. Macovschi, V. Frunzeti-elefteresCu, St. cerc. biochim., **12**, *2*, 115 (1969).
15. E. Macovschi, *Materia vie și geneza ei*, Contemporanul, nr. 34 din august 1958 și *Materialismul dialectic și științele contemporane ale naturii* Edit. politică, București, 1959.
16. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **6**, *4*, 467 (1963).

THE BIOSTRUCTURAL THEORY OF ELECTROENCEPHALOGRAPHIC WAVES

SUMMARY

The biostructural theory of electroencephalographic waves is based on some premises deduced from features of biostructure, viz.: biostructure can partially break up and release water, ions and other substances; the partial breakdown of biostructure is reversible; restoration of partially broken down biostructure requires expenditure of biochemical energy. Some experimental arguments support these premises; they result from the examination, in the light of biostructural conception, of radioactive sodium efflux from giant axons in Sepia, as well as of composition of some saps expressed from corn or cabbage leaves, under certain conditions.

Among phenomena involved in the appearance of electroencephalographic waves were analysed: the release and integration into biostructure of ions, water and other subtances; ion and water exchange between the intracellular solution and the extracellular medium; influence of this exchange upon cell membrane polarization and intracelular solution concentration; activity of the self-regulation mechanism which spends biochemical energy and ensures biostructure restoration, after a certain degree of its partial breakdown. The periodical development of these phenomena, among which some are antagonistic, leads to a periodical variation of ion concentration in the intracellular solution which, in turn, induces variations in cell bioelectric potantials and appearance of electroencephalographic waves. The route of these waves depends on the development of these phenomena, on their intensity, as well as on biostructure state. Pulses resulting from activity of receptors or of nervous system itself, can also induce changes in the route of electroencephalographic rhythm when they act upon biostructure.

Frequency of electroencephalographic waves is conditioned by frequency of biostructure pulsations; amplitude of these waves depends on variations of ion concentration in intracellular solution with respect to extracellular medium; magnitude of these two parameters is caused by the thickness of the biostructure layer which breaks down and recovers during each pulsation.

The above considerations permit the explanation of the biphase aspect of electroencephalographic waves, dependence of wave amplitude on their frequency, spindle appearance in the routes of electroencephalographic rhythms and the blocking of these rhythms under a prolonged action of sensory stimuli.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 347 – 351 (1970)

IZOENZIMELE IZOCITRAT DEHIDROGENAZEI ŞI GLUTAMAT DEHIDROGENAZEI DIN MUŞCHII STRIAŢI LA DIFERITE VERTEBRATE[1]

DITA COTARIU

Rezumat — Se descriu particularităţile modelelor izoenzimatice IDH şi GDH din musculatura striată la mai multe specii de vertebrate situate pe diferite trepte de evoluţie. Se discută corelaţiile dintre particularităţile acestor modele izoenzimatice şi poziţia taxonomică a speciilor investigate.

În lucrări anterioare [1] — [3] s-a semnalat importanţa cercetării comparative a proprietăţilor unor enzime provenind din surse filetice diferite, atît pentru stabilirea înrudirii sau filiaţiei acestor proteine cît şi pentru obţinerea unor indicaţii asupra diferenţierii arhitecturii edificiului proteic. În acest sens, s-a arătat că studiul modelelor unor izoenzime provenind din organe omologe, de la specii situate pe cele mai diferite trepte de evoluţie, permite stabilirea unor relaţii de omologie filogenetică între anumite enzime cu rol major în metabolismul celular. Lucrarea de faţă se ocupă cu studiul modelelor izoenzimatice ale NADP-izocitrat dehidrogenazei (IDH) şi NAD-glutamat dehidrogenazei (GDH) din muşchii striaţi în seria vertebratelor. Scopul lucrării este de a evidenţia eventualele relaţii dintre enzime care catalizează aceeaşi reacţie la specii deosebite, pe baza comparării proprietăţilor electroforetice ale proteinelor respective.

IDH catalizează oxidarea izocitratului la α-cetoglutarat în prezenţa ionilor de Mn^{2+}; în muşchiul cardiac de şobolan, ea apare sub două forme moleculare [4], [5]. S-a postulat existenţa enzimei atît în fracţiunea mitocondrială cît şi în cea extramitocondrială [6]; cele două forme prezintă diferenţe imunologice[7]. În extracte de muşchi cardiac uman s-a semnalat prezenţa a două benzi cu activitate izocitrat dehidrogenazică, pe cînd în fracţiunea mitocondrială cardiacă de şoarece doar una [8].

GDH, care catalizează dezaminarea oxidativă a glutamatului la α—cetoglutarat, se găseşte exclusiv în spaţiul intramitocondrial. Interesul suscitat de această enzimă se datoreşte şi faptului că ea suferă un proces de disociere-asociere, în diferite condiţii experimentale [9], [10]. Enzima cristalizată, constituită din trei componenţi distincţi imunologic [11], se prezintă sub forma unei benzi electroforetice unice [11]. S-a semnalat totuşi că GDH extrasă din ţesuturi umane poate fi separată prin electro-

[1] Asistenţa tehnică A. Radu.

foreză în gel de agar în cinci fracţiuni [12]. Această contradicţie a fost explicată pe baza observaţiei că benzile multiple cu activitate glutamat dehidrogenazică reflectă, de fapt, acţiunea nespecifică a lactat dehidrogenazei asupra glutamatului [13].

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe muşchi scheletici proveniţi de la 11 specii situate pe diferite trepte de evoluţie, reprezentînd cele 5 clase de vertebrate : peşti (*Rutilus rutilus*, *Scardinius erythrophtalmus*), amfibii (broască), reptile (şopîrlă, broască ţestoasă, şarpe), păsări (porumbel, raţă) şi mamifere (arici, şobolan, iepure). În general s-au folosit muşchii gastrocnemieni, şi doar în unele cazuri (peşte, şopîrlă, şarpe) muşchii scheletici dorsali. Muşchii prelevaţi imediat după sacrificare (de la 2 — 6 indivizi, după caz) au fost spălaţi în mod repetat cu soluţie fiziologică rece, tamponaţi cu hîrtie de filtru şi cîntăriţi.

Extracţia proteinelor s-a făcut în apă distilată, în raportul de 3/1 V/g. După 90 min de extracţie, omogenatele obţinute la rece au fost centrifugate timp de 10 min la 2 000 rot/min ; supernatantele respective au fost congelate cu zăpadă carbonică şi decongelate de 2 — 3 ori, apoi recentrifugate 40 min la 22 000 × g (+2°C). Concentraţiile proteice au variat între 1,2 şi 1,5 g la 100 ml. Concentraţiile proteice ale extractelor fiind relativ mici, înainte de a fi supuse electroforezei, probele au fost concentrate timp de 45 min. pe Carbowax, la +4°C (în raport de 3/1).

Electroforeza în gel de amidon, pentru evidenţierea izoenzimelor, s-a efectuat la pH 7. IDH este instabilă la pH peste 7,8, [14], obţinîndu-se rezultate favorabile prin electroforeză la pH 7,0 şi 6,0 [15]. GDH poate fi şi ea separată prin electroforeză în gel de amidon, la pH 7 [16]. Gelul s-a obţinut cu o soluţie de amidon 14 % în tampon Na_2HPO_4 8,6 mM-citrat 1,4 mM ; în cuve s-a folosit o soluţie tampon Na_2HPO_4 32 mM—citrat 4 mM. Condiţiile de fracţionare electroforetică au fost următoarele : tensiune 10 V/cm, intensitate 2,6 mA/cm, durata 5 ore, la +4°C. S-au aplicat 400γ proteină. Separarea formelor moleculare ale GDH s-a făcut în paralel şi prin electroforeză în gel de agar, la pH 8,6 (6). Gelul s-a obţinut cu o soluţie de 1 % agar în tampon veronal, pH 8,6. S-a aplicat o diferenţă de potenţial de 16 V/cm şi o intensitate de 2,5 mA/cm, iar durata migrării a fost de 120 min, la +4°C. Separarea electroforetică a proteinelor în gel de amidon, s-a făcut şi la pH 8,5, iar fracţiunile proteice au fost revelate cu o soluţie de amidoblack B, după secţionarea prealabilă a gelului.

Evidenţierea fracţiunilor izoenzimatice s-a făcut prin procedeul imersiei, aşa cum s-a arătat şi anterior [1]—[3]. În cazul IDH, incubarea s-a făcut timp de 60 min la 37°C, într-un mediu de reacţie care conţinea tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 8,5, izocitrat de sodiu 0,1 M, $MnCl_2$ 0,25 M, nitroblue tetrazolium, NADP şi fenazinmetosulfat [12]. Evidenţierea GDH s-a făcut într-un mediu de reacţie care conţinea TRIS-HCl 0,1 M, pH 8,5, glutamat de sodiu 2 M, nitroblue tetrazolium, NAD şi fenazinmetosulfat (acceptori intermediari) [12]. În ambele cazuri mediul de incubare a fost preparat extemporaneu.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Modelele electroforetice ale izocitrat dehidrogenazei din muşchiul scheletic de diferite vertebrate sînt redate în figura 1.

Aşa cum reiese din figură, gradul de eterogenitate al enzimei este relativ redus, evidenţiindu-se una sau cel mult două fracţiuni izoenzimatice. Astfel, la cele două specii de peşti investigate (*a*, *b*), precum şi la broască (*c*), s-a revelat existenţa unei singure fracţiuni, cu mobilitate anodică mică; de asemenea, dintre reptile, broasca ţestoasă şi şarpele (*e*, *f*) prezintă tot o singură fracţiune cu mobilitate anodică redusă. La vertebratele superioare, şi anume la păsări (*g*, *h*) şi la mamifere (*i*, *j*, *k*), se remarcă, la toate speciile investigate, prezenţa a două benzi cu activitate enzimatică izocitrat dehidrogenazică. Rezultatele acestea sînt în concordanţă cu unele date din literatură obţinute pe muşchi cardiac de mamifere [4], [5]. Un loc aparte îl ocupă şopîrla (*d*) la care, ca şi la vertebratele superioare, se constată prezenţa a două fracţiuni izoenzimatice IDH. Cele două fracţiuni izoenzimatice găsite la şopîrlă au mobilităţi anodice reduse şi relativ apropiate, prima fiind situată în imediata proximitate a startului. La cele două specii de păsări investigate, distribuţia celor două fracţiuni este foarte asemănătoare, una situîndu-se în regiunea catodică din apropierea startului, iar cealaltă prezentînd o mobilitate anodică mai mult sau mai puţin redusă. Dintre mamifere, iepurele (*i*) prezintă un model izoenzimatic asemănător cu al păsărilor, una din fracţiuni avînd o mobilitate catodică mică, iar cealaltă o mobilitate anodică relativ redusă, totuşi ceva mai mare decît a fracţiunii corespunzătoare din muşchiul de păsări. În sfîrşit, se constată că la şobolan (*j*) şi la arici (*k*) cele două fracţiuni evidenţiate au şi ele mobilităţi anodice mici, una fiind distribuită chiar în regiunea startului, iar cealaltă într-o zonă relativ apropiată.

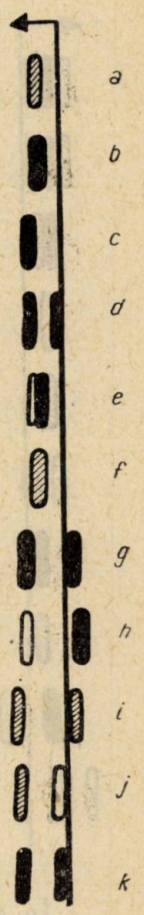
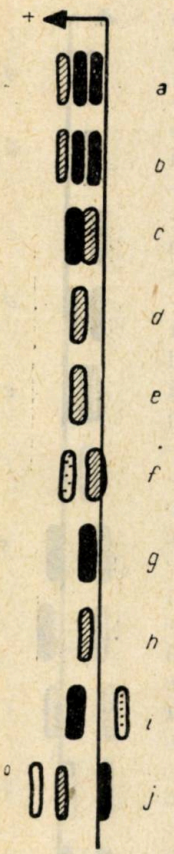


Fig. 1. — Modelele electroforetice ale IDH din muşchi striat, la diferite vertebrate.

a — *Rutilus rutilus*; *b* — *Scardinius erythrophtalmus*; *c* — broască; *d* — şopîrlă; *e* — broască ţestoasă; *f* — şarpe; *g* — porumbel *h* — raţă; *i* — iepure; *j* — şobolan; *k* — arici.

Distribuţia activităţii enzimatice pe cele două fracţiuni (acolo unde este cazul) prezintă unele variaţii; astfel, la broască (*c*), activitatea este cu precădere distribuită pe fracţiunea cea mai lentă, spre deosebire de şopîrlă (*d*), unde ea apare pe fracţiunea cea mai rapidă. Dintre păsări, la porumbel (*g*) activitatea enzimatică este distribuită în mod egal pe cele două fracţiuni, iar la raţă (*h*) ea este concentrată în special pe fracţiunea cu migrare catodică. La iepure (*i*), de asemenea, activitatea enzimatică apare repartizată cu aceeaşi intensitate pe ambele fracţiuni, în timp ce la arici (*k*) ea este localizată în special pe fracţiunea mai lentă. Dimpotrivă, la şobolan (*j*), fracţiunea mai rapidă este mult mai activă decît cea lentă.

Ca o caracteristică generală, IDH manifestă în seria vertebratelor o eterogenitate redusă, fracţiunile frontale cu mobilităţi anodice părînd a fi comune în evoluţia enzimei musculare. Este demn de relevat, de asemenea, că la vertebratele superioare sînt totdeauna prezente două fracţiuni izoenzimatice, pe cînd la vertebratele inferioare apare doar o singură fracţiune. Aspectul modelelor izoenzimatice la diferitele specii de vertebrate sugerează, totuşi, existenţa unui anumit grad de conservare a unor trăsături moleculare ale proteinei respective.



În figura 2 sînt prezentate modelele electroforetice ale glutamat dehidrogenazei din muşchii scheletici, în seria vertebratelor. Din figură reiese clar că enzima posedă grade de eterogenitate variabile la diferite vertebrate. Astfel, la ambele specii de peşti (*a*, *b*) se remarcă existenţa a trei fracţiuni izoenzimatice, bine individualizate; amfibiile (*c*) prezintă două fracţiuni, pe cînd la reptile (*d*, *e*) se observă doar o singură fracţiune. Dintre cele două specii de păsări investigate, la porumbel (*f*) se observă două fracţiuni (cea de a 2-a cu activitate foarte redusă), iar la raţă (*g*) o fracţiune unică, în strînsa vecinătate a startului. La mamifere se observă o diferenţiere a gradului de eterogenitate în funcţie de specie; astfel, ariciul (*h*) prezintă o singură fracţiune, şobolanul (*i*) două fracţiuni, pe cînd iepurele (*j*) trei. Mai mult, distribuţia acestor fracţiuni este întrucîtva diferită. Din punct de vedere al migrării electroforetice, fracţiunile GDH se deplasează în general spre anod, cu excepţia fracţiunilor celor mai lente din muşchii de şobolani (*i*) şi iepure (*j*), care se deplasează spre catod. În general, mobilităţile electroforetice ale benzilor cu activitate glutamat dehidrogenazică sînt relativ reduse.

Fig. 2.— Modelele electroforetice ale GDH din muşchi striat, la diferite vertebrate.
a — *Rutilus rutilus*; *b* — *Scardinius erythrophtalmus*; *c* — broască; *d* — broască ţestoasă; *e* — şarpe; *f* — porumbel; *g* — raţă; *h* — arici; *i* — şobolan; *j* — iepure.

În ce priveşte distribuţia activităţii enzimatice pe diferitele fracţiuni, se observă de asemenea deosebiri marcate în funcţie de specie. Astfel, la peşti activitatea este localizată în special pe cele două fracţiuni cu migrare anodică mai lentă, iar la amfibii şi unele mamifere (şobolan), pe fracţiunile frontale. Spre deosebire de acestea, la iepure, fracţiunea cea mai lentă, cu migrare catodică, este purtătoarea activităţii glutamat dehidrogenazice maxime. Trebuie remarcat, de asemenea, că şi la unele păsări (porumbel) activitatea este concentrată mai cu seamă pe fracţiunea cea mai lentă, situată în imediata vecinătate a startului.

Ca o caracteristică generală, trebuie subliniat faptul că modelele izoenzimatice GDH prezintă, în seria vertebratelor, o specificitate de specie mai mult sau mai puţin accentuată, atît în ceea ce priveşte poli-

morfismul enzimei, cît şi mobilităţile electroforetice ale diferitelor tipuri de fracţiuni şi localizarea activităţii enzimatice pe acestea. Totuşi, nu poate fi exclusă nici posibilitatea ca unele fracţiuni să se datoreze unei activităţi nespecifice a altei enzime asupra glutamatului [13].

CONCLUZII

Izoenzimele IDH şi GDH din muşchii scheletici de vertebrate situate pe diferite trepte de evoluţie prezintă anumite caracteristici interesînd gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică a fracţiunilor şi localizarea activităţii enzimatice pe aceste fracţiuni.

Izoenzimele IDH din muşchii scheletici ai diferitelor vertebrate prezintă un grad relativ mare de omogenitate şi o mobilitate electroforetică redusă. Caracteristicile modelelor izoenzimatice IDH evidenţiate, sugerează existenţa unui anumit grad de conservare a unor trăsături moleculare.

Modelele izoenzimatice GDH prezintă, în seria vertebratelor, o specificitate de specie mai mult sau mai puţin accentuată.

Prezentat la redacţie la 13 iulie 1970

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Şerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim, **12**, 173 (1969).
2. D. Cotariu, M. Şerban, Rev. roum. biochim., **6**, 11 (1969).
3. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. biol. seria Zool., **3**, 149 (1970).
4. M. U. Tsao, Arch. Biochem. Biophys. **90**, 234 (1960).
5. D. N. Baron, J. L. Bell, Proc. Ass. Clin. Biochem. **2**, 8 (1962).
6. J. L. Bell, D. N. Baron, Biochem. J., **90**, 8P (1964).
7. J. M. Lowenstein, S. R. Smith, Biochem. Biophys. Acta, **56**, 385 (1962).
8. A. L. Latner, A. W. Skillen, în *Isoenzymes in biology and Medicine*, Academic Press, London, New York , 1968, p. 44.
9. K. L. Yielding, G. M. Tomkins, M. W. Bitensky, N. Talal, Canad. J. Biochem., **42**, 727, (1964).
10. J. C. Warren, D. O. Carr, S. Grisolia, Biochem. J. , **93**, 409 (1964).
11. N. Talal, G. M. Tomkins, J. F. Mushinski, K. L. Yielding, J. Mol. Biol. **8**, 46 (1964).
12. H. J. van der Helm, Nature, **194**, 773 (1962).
13. A. M. Katz, W. Kalow, Canad. J. Biochem., **43**, 1653 (1965).
14. D. M. Campbell, D. W. Moss, Proc. Ass. Clin. Biochem., **2**, 10 (1962).
15. N. S. Henderson, J. exp. Zool., **158**, 263 (1965).
16. I. H. Fine, L. A. Costello, în *Methods in Enzymology*, ed. S. F. Colowick, Kaplan, N. O., Academic Press, 1963, vol. VI, p. 958.

ISOCITRATE DEHYDROGENASE AND GLUTAMATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES IN SKELETAL MUSCLES OF DIFFERENT VERTEBRATES

SUMMARY

Some peculiarities of isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase isoenzyme patterns in skeletal muscles of several vertebrate species placed on different evolutionary steps are described. Relationships between peculiarities of isoenzyme patterns and the taxonomic position of investigated species are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 353 – 356 (1970)

RELAȚII ÎNTRE ACTIVITATEA CATALAZEI SANGUINE ȘI METABOLIZAREA ETANOLULUI ÎN ORGANISM

A. CSONTOS

Rezumat. — S-a studiat acțiunea etanolului asupra activității catalazei sanguine, prin experiențe efectuate *in vitro* și *in vivo*, constatîndu-se că la persoane sănătoase, cu catalazemia inițială normală, etanolul nu modifică activitatea enzimei. Administrînd însă alcool etilic 1 g/kg corp în 200 ml apă la persoane cu catalazemia inițială crescută sau scăzută, se constată modificări diferite. Nu alcoolemia ca atare, ci mai mult starea în care se află organismul cercetat este factorul primordial, care explică felul diferit al modificărilor enzimatice instalate.

Literatura de specialitate prezintă date contradictorii în ceea ce privește contribuția sistemului catalazic în procesul metabolizării etanolului [9], [13].

În urma cercetărilor multilaterale efectuate de Lutwah-Mann[12] Theorell, Bonnischen [14], Jakobsen [10] și alții se precizează că din cantitatea de etanol pătrunsă în organism, 80% este descompusă de alcool-dehidrogenază, 10% prin sistemul catalazic, iar restul se elimină prin plămîni și urină. Keilin și Mann [11] pun ipoteza unei oxidări peroxidative a etanolului în organism, prin intervenția catalazei sanguine. Bartlett (citat în [10]) neagă existența acestui mecanism de oxidare, afirmînd că oxidarea etanolului se face aproape exclusiv în ficat. Westerfeld (citat în [9]) la fel contestă participarea catalazei la oxidarea etanolului (*in vivo*). Cotrău și colab. [1], prin experiențe efectuate la alcoolici cronici, de asemenea nu constată o participare efectivă a catalazei în procesul metabolizării alcoolului *in vivo*.

Procesul de oxidare a alcoolilor presupus prin sistemul catalazic, influența alcoolului etilic asupra hormonilor corticosteroizi, formarea complexului catalază-apă oxigenată sînt numai unele dintre multiplele posibilități, care ne permit să presupunem existența unei corelații între acțiunea etanolului și activitatea catalazei sanguine. Astfel, Fazekas și colab. [8] administrînd șobolanilor alcool etilic (0,4 g/100 g) ,au arătat că etanolul prin stimularea secreției hormonilor de tip corticosteroid stimulează activitatea catalazei sanguine. Jakobsen [10] susține pe de altă parte existența unei corelații între acțiunea substanțelor corticosteroide și activitatea alcool-dihidrogenazei.

Fără a putea da un răspuns definitiv în această problemă controversată, ne-am propus să studiem și noi în cadrul lucrării de față corelația

între procesul metabolizării alcoolului etilic şi modificarea activităţii catalazei sanguine prin

a) experienţe efectuate *in vitro*, urmărind dacă activitatea catalazei se modifică sau nu în urma măririi cantităţii de alcool etilic adăugat la aceeaşi cantitate de sînge;

b) experienţe efectuate *in vivo*, prin administrare de alcool etilic (*per os*).

MATERIAL ŞI METODE

Activitatea catalazei sanguine a fost determinată după o variantă proprie a metodei Bach-Zubkova [6]. Pentru cercetările efectuate *in vitro* (100 analize), la 1 ml de sînge am adăugat cantitatea de 0,001 — 10 mg alcool etilic (pH 7,2 — 7,4). La persoanele (voluntari) examinate (150 de cazuri), după ce li s-a recoltat sînge pentru determinarea catalazemiei iniţiale, am administrat alcool etilic (1g/kg corp) în 200 ml apă. Determinările de control au fost efectuate la 30, 60 şi 240 minute după administrarea alcoolului etilic.

Rezultatele obţinute s-au interpretat prin calcul statistic (testul t).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute în experienţele *in vitro* sînt prezentate în tabela 1 iar cele obţinute *in vivo* în tabela 2. Menţionăm că în condiţii similare, cînd am administrat persoanelor examinate alcool etilic sub 0,5 g/kg corp, activitatea catalazei sanguine nu s-a modificat în mod semnificativ.

Rezultatele noastre evidenţiază că alcoolul etilic (*in vitro*) nu influenţează în mod semnificativ activitatea catalazei sanguine, nici în doze toxice. Inhibiţia activităţii începe abia la cantităţi care depăşesc cu mult (100 g/1000 ml) cantitatea alcoolului posibilă în sînge. Inhibiţia activităţii catalazei prin aceste doze crescute de alcool se datoreşte, pro-

Tabela 1

Modificarea activităţii catalazei sanguine *(in vitro)* în cazul cînd la sistemul de reacţie enzima-substrat am adăugat alcool etilic în cantităţi diferite (substrat apă oxigenată, la pH 7,2 — 7,4, temperatura 37° C, timp de reacţie 30 min)

Cantitatea alcoolului etilic (mg/1mμl sînge)	Nr. cazurilor examinate	Activitatea catalazei sanguine (mg)				
		înainte de etanol		după etanol		
		M	D±	M	D±	P
0,001	15	7,65	0,05	7,55	0,08	0,2—0,3
0,01	15	7,80	0,08	7,70	0,07	0,1—0,2
0,1	30	7,70	0,07	7,65	0,05	0,3—0,4
5	20	7,90	0,07	7,75	0,08	0,02—0,05
10	20	7,40	0,1	6,8	0,08	0,001

Explicaţia prescurtărilor din tabelă:

M = activitatea catalazei calculată în valori medii (mg), D ± = deviaţia standard, P = probabilitate de transgresiune.

Tabela 2

Acţiunea alcoolului etilic asupra activităţii catalazei sanguine *(in vivo)* la diferite intervale de timp după ingerare (substrat apă oxigenată, la pH 7,2 – 7,4, temperatura 37° C, timp de reacţie 30 min)

Activitatea catalazei după etanol (1 g/kg corp)	Nr. cazurilor examinate	Valoarea iniţială		Activitatea enzimei (mg)								
				30 min			60 min			4 ore		
		M	D±	M	D±	P	M	D±	P	M	D±	P
a scăzut	76	10,4	0,1	9,68	0,1	0,001	9,8	0,09	0,001	9,9	0,08	0,001
a crescut	54	6,65	0,05	7,33	0,06	0,001	7,1	0,07	0,001	6,9	0,1	0,001 – 0,01
nu s-a modificat (semnific.)	20	7,8	0,08	7,8	0,09	0,3–0,4	7,6	0,01	0,1–0,2	7,6	0,1	0,1–0,2

babil, unei acţiuni directe asupra componentului proteic din enzimă, modificînd structura ei.

Fixînd cantitatea alcoolului introdus în organism la 1 g/kg corp, am înregistrat modificări diferite în activitatea catalazei sanguine :

a) dacă înainte de administrarea alcoolului activitatea catalazei este crescută, atunci etanolul contribuie la o scădere semnificativă a activităţii în cursul experienţei ;

b) dacă activitatea iniţială a enzimei este uşor scăzută, atunci după administrarea alcoolului această activitate creşte. Concentraţia alcoolului din sînge la 30 min, după ingerarea alcoolului era în medie de 0,85 g/1000 ml, iar la 60 de min, 0,75 g/1000 ml. La 4 ore după administrarea alcoolemia era, în medie de 0,2 g/1000 ml.

Întrucît alcoolemia—indiferent de sensul modificărilor constatate în activitatea catalazei sanguine—după administrarea alcoolului prezintă aproximativ aceleaşi valori putem conchide că modificările enzimatice instalate sînt legate de starea fizio-patologică în care se află organismul în momentul cercetării. După cum am mai arătat, hiper sau hipoactivitatea catalazică iniţială poate să fie considerată ca o manifestare care însoţeşte anumite stări patologice, fie pe baza unei funcţii compensatorice [4], [5], [7], fie prin carenţa de fier [6], sau prin modificări intervenite în structura enzimei. De asemenea, am mai demonstrat [3], [5] că la persoane sănătoase activitatea catalazei sanguine scade în urma administrării histaminei, adrenalinei şi A.C.T.H-lui, presupunînd astfel o acţiune directă şi un răspuns indirect din partea suprarenalei.

În posesia acestor date, acţiunea alcoolului etilic asupra activităţii catalazei sanguine se explică deci mai mult prin acţiunea directă a etanolului asupra sistemului cortico-suprarenal, declanşînd o serie de reacţii care se manifestă prin modificarea activităţii enzimei numai în cazul cînd funcţia ei iniţială este deja dereglată. Aşa se explică şi faptul că la persoane sănătoase, cu catalazemia normală, etanolul nu a produs modificări semnificative în activitatea enzimei, nici în cantităţi de 1 g/kg corp.

CONCLUZII

Bazaţi pe cercetările noastre de faţă, precum şi pe date din literatura de specialitate presupunem că existenţa unei corelaţii între procesul me-

tabolizării alcoolului etilic şi funcţia sistemului catalazic s-ar putea face sesizabilă mai uşor la nivelul proceselor oxido-reducătoare tisulare decît în sîngele periferic. Alcoolemia uşor pronunţată nu modifică ca atare activitatea catalazei sanguine, cu excepţia cazurilor cînd funcţia iniţială a enzimei este deja dereglată. În aceste cazuri, fenomenul trebuie înţeles prin prisma unor procese compensatorii, răspunsul nespecific faţă de această noxă, prin modificarea reactivităţii organismului.

Prezentat la redacţie la 23 decembrie 1969

Laboratorul Centralizat
al Spitalului Clinic nr. 2
Policlinica nr. 2, Tîrgu Mureş

BIBLIOGRAFIE

1. Cotrău, M., Vasiliu Ana, Freund, S, Pirozinscki, T. Ghimicescu, Gh., Igiena, **18**, 29 (1969).
2. Csontos, A., St. cerc. biochim., **8**, 307 (1965).
3. Csontos, A., St. cerc. biochim., **11**, 255 (1968) .
4. Csontos, A., Jaklovszky, D., Medicina Internă, **18**, 607 (1966).
5. Csontos, A., St. cerc. biochim., **10**, 5 (1967).
6. Csontos, A., Birău Hortensia, Medicina Internă, **17**, 331 (1965).
7. Csontos, A., Oncologia şi Radiologia, **6**, 413 (1967).
8. Fazekas, I. Gy., Posgay, K., Farkas, I., Kisérleti Orvostudomány Budapest, **17**, 481 (1965).
9. Heller, H., Arzneimittel Forschung, **10**, 1318 (1968).
10. Jakobsen, E., Dtsch. med. Wschrifft, **75**, 645 (1960).
11. Keilin, D., Mann, T., Proc. Roy. Soc., **122**, 298 (1937).
12. Lutwah — Mann, C., Biochem. J., **32**, 1364 (1938).
13. Maszi, J., Macher, T., Kisérleti Orvostudomány Budapest, **14**, 567 (1963).
14. Theorell, H., Bonnischsen, R. K., Scand. J. Lab. Clin. Invest., **3**, 58 (1951).

RELATIONSHIPS BETWEEN BLOOD CATALASE ACTIVITY AND ETHANOL METABOLISM IN THE BODY

SUMMARY

Ethanol action upon blood catalase activity was studied *in vitro* and *in vivo*. In healthy persons, with normal initial catalasemia, ethanol does not affect enzyme activity. However, different changes were found when 1 g/kg body in 200 ml water ethanol was given to individuals with either increased or decreased initial catalasemia. The state of the organism rather than alcoholemia is the prevailing factor which accounts for the type of enzyme changes.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 357–364 (1970)

MODIFICĂRI BIOCHIMICE PRODUSE ÎN PLANTELE DE GRÎU INFECTATE CU *TILLETIA CONTROVERSA*

LUCREȚIA DUMITRAȘ, ELVIRA GROU și ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — Rezultatele prezentate aduc unele contribuții la clarificarea raporturilor parazit-plantă gazdă într-un caz mai aparte, în care plantele de grîu suferă importante modificări sub influența parazitului *Tilletia controversa*, manifestate prin înfrățire abundentă și piticire accentuată. Se prezintă în lucrare modificările biochimice produse de parazit la nivelul auxinelor și al aminoacizilor liberi și diferențierea acestor modificări în funcție de faza de dezvoltare a plantei gazdă. Se poate deduce că înfrățirea abundentă a plantelor bolnave provine din starea de hiperauxinie instalată în faza de coleoptil, iar fenomenul de piticire accentuată s-ar datora unei activități scăzute a componentelor cu activitate de creștere, în favoarea inhibitorilor, constatată la probele în faza de înfrățire.

Spre deosebire de alte specii care produc mălura la cereale, *Tilletia controversa* prezintă un interes deosebit, atît prin cerințele sale biologice caracteristice, cît și prin simptomele produse la plantele gazdă.

Dacă din punct de vedere biologic această specie este relativ bine cunoscută, nu se poate spune prea mult în legătură cu cauzele care provoacă simptomele extrem de pronunțate și caracteristice la planta gazdă, manifestate prin înfrățire abundentă și piticire foarte accentuată, care nu se întîlnesc la plantele atacate de la alte specii de *Tilletia*, parazite pe cereale[1].

Din lucrările unor autori reiese că alterarea metabolismului substanțelor regulatoare de creștere ar putea fi responsabilă de schimbările morfologice ale plantei atacate. Astfel, Sequeira [2] și Goodman și colab. [3] arată că substanțele de creștere joacă un rol deosebit în complexul parazit-plantă gazdă. Macko și Novacky [4] și Novacky și Macko [5], plecînd de la ideea că acidul indolil-acetic este omniprezent și că echilibrul său este menținut în plantele sănătoase printr-o enzimă oxidativă, denumită indolacet-oxidază, au studiat comparativ activitatea acestei enzime, la plantele infectate și la cele sănătoase. Ei au constatat că în plantele infectate activitatea acestei enzime este inhibată sub influența parazitului și că schimbările morfologice nu par să fie corelate cu modificările în activitatea enzimatică.

În lucrarea de față prezentăm rezultatele cercetărilor întreprinse în cadrul unui studiu complex al speciilor de *Tilletia*, în scopul deter-

minării modificărilor biochimice (metabolice) la nivelul auxinelor și al aminoacizilor liberi, și să aducem o contribuție la stabilirea unor legături între aceste modificări și cele morfologice, produse de parazit.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele s-au efectuat pe plante de grîu Triumph, inoculate artificial cu *T. controversa* și crescute în seră după metoda lui Niemann [6]. Probele au fost luate în trei faze : coleoptil[1], două frunze și la înfrățire. Probe identice s-au recoltat la aceleași date de la plantele sănătoase. Controlul materialului infectat s-a efectuat microscopic, pe secțiuni în tulpinile plantelor; acelea care nu conțineau miceliul ciupercii au fost îndepărtate, obținîndu-se astfel probe infectate 100%.

Extracția auxinelor din plantele de grîu s-a făcut folosind eter etilic purificat (fără peroxizi), după metoda descrisă de Benet-Clark și Kefford [7]. În extractele eterice brute, concentrate, s-a determinat conținutul în auxine și aminoacizi liberi.

Determinarea activității auxinei prin testul biologic Avena s-a făcut după metoda dată de Audus [8], folosind în experiențele noastre cariopse decorticate de ovăz din soiul Cenad 88. După îndepărtarea eterului, reziduul obținut s-a reluat în 10 ml soluție de zaharoză 2%, iar soluția astfel formată s-a diluat succesiv în raporturile 1 :10, 1 :100, 1 :1000 și 1 : 10000. Extractul eteric s-a cromatografiat pe hîrtie după metoda menționată [7] și fracțiunile separate au fost testate pentru activitatea lor biologică.

Conținutul în aminoacizi s-a determinat în extractul acetonic după indicațiile lui Haïs și Macek [9].

Experiențele au fost urmărite timp de doi ani consecutivi, pe 4 serii de plante.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În ceea ce privește conținutul în aminoacizi liberi, în faza de coleoptil materialul prezintă deosebiri marcante la nivelul triptofanului și al tirozinei, în sensul că triptofanul este predominant la materialul infectat, iar tirozina la cel sănătos (fig. 1). În faza de două frunze, deosebirile sînt evidente la nivelul fenilalaninei, care predomină în probele infectate (fig. 2). În faza de înfrățire apar modificări evidente la nivelul triptofanului, care este mai crescut la materialul sănătos (fig. 3).

În ceea ce privește conținutul în derivați indolici, analiza compușilor β — indolil-acetici prin metoda cromatografiei pe hîrtie nu a fost satisfăcătoare, deoarece nu a permis o evaluare riguros cantitativă a rezultatelor obținute. Aceasta însă a fost posibilă prin estimarea activității biologice cu ajutorul testului Avena.

[1] Pentru această fază s-au făcut unele schimbări față de metoda Niemann : cariopsele germinate și inoculate au fost puse la 5—8°C timp de 18—20 zile, apoi controlate pentru prezența miceliului, după care s-au dat la analiză, fără a fi transplantate în ghivece cu pămînt.

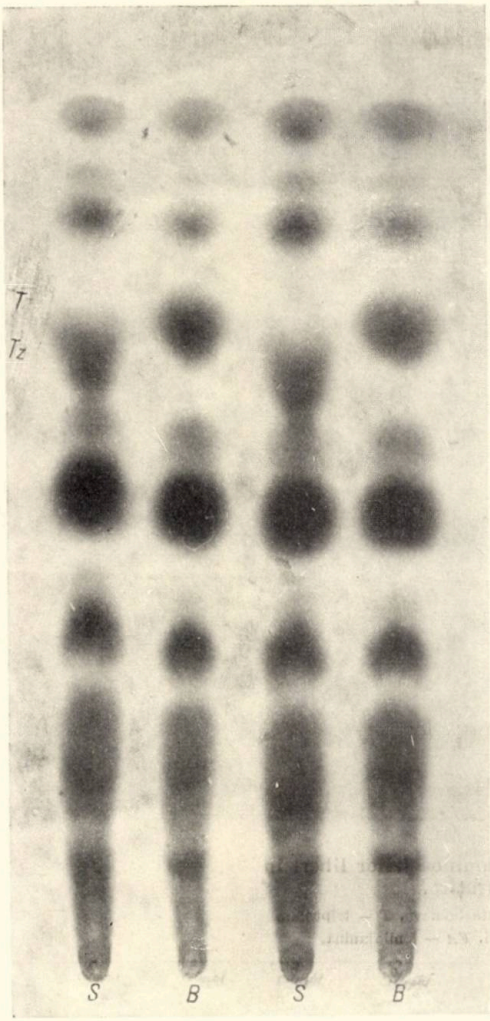


Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor liberi în faza de coleopatil.

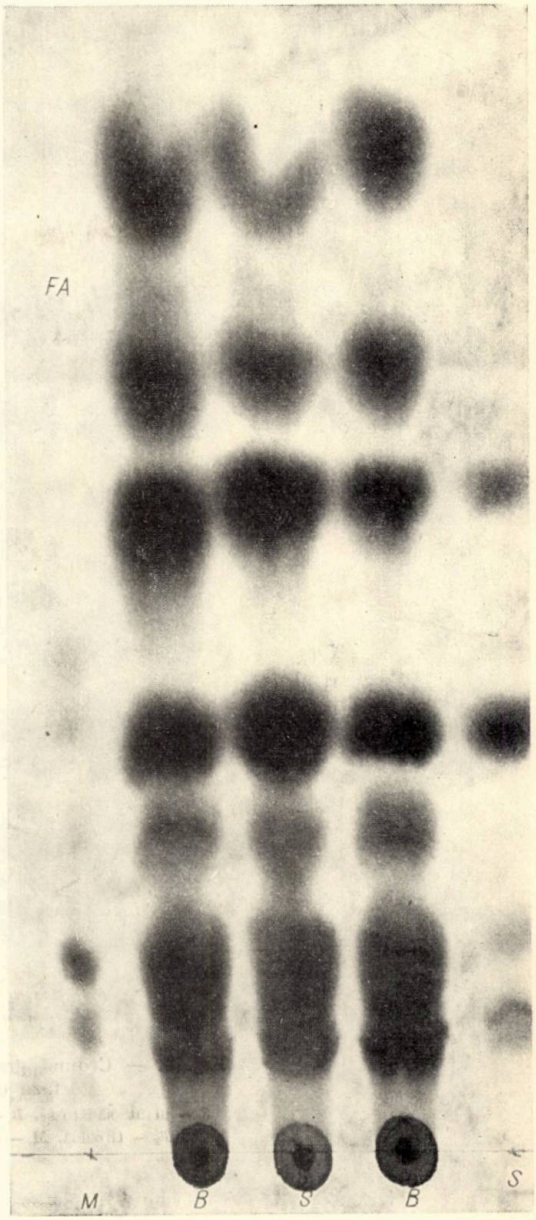


Fig. 2. — Cromatograma aminoacizilor liberi în faza de două frunze.

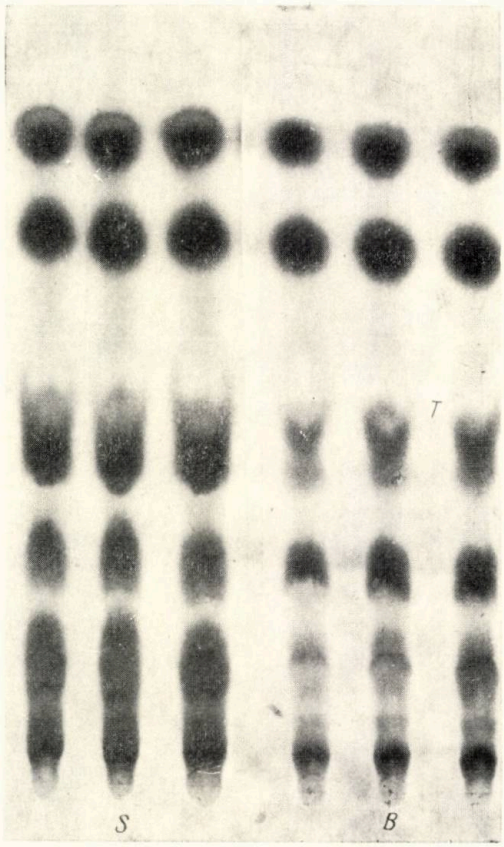


Fig. 3. — Cromatograma aminoacizilor liberi în faza de înfrățire.

S — plante sănătoase, *B* — plante bolnave, *T* — triptofan, T_z — tirozină, *M* — martori, *FA* — fenilalanină.

Graficele sînt întocmite pe baza creşterilor medii ale coleoptilelor de ovăz, în raport cu un martor realizat în aceleaşi condiţii de experimentare. Se observă (fig. 4 *A*) că extractul eteric de la materialul în faza de coleoptil infectat are o activitate de stimulare superioară aceleia a extractului obţinut de la materialul sănătos. În cazul diferitelor fracţiuni separate cromatografic din aceleaşi extracte eterice (fig. 4 *B*), se constată că componentele separate din extractul eteric de la probele infectate au o activitate de stimulare superioară faţă de cele sănătoase. Se remarcă analogia între rezultatele obţinute cu extractul total şi cele obţinute cu fracţiunile cromatografice. În faza de două frunze, extractul eteric obţinut din partea bazală a tulpinilor (fig 5 *A*) prezintă diferenţe remarcabile, în sensul că la materialul infectat activitatea de stimulare este mărită. La extractele obţinute din materialul fără partea bazală, cu excepţia diluţiei de 1 :1000, nu sînt diferenţe remarcabile. Rezultatele obţinute la analiza componentelor separate cromatografic (fig. 5 *B*) evidenţiază atît fracţiuni stimulatoare cît şi fracţiuni inhibitoare. Fracţiunile separate din materialul sănătos, fără partea bazală a tulpinilor, prezintă o acţiune de stimulare inferioară faţă de aceea a fracţiunilor separate din acelaşi material, însă infectat. În cazul fracţiunilor separate din partea bazală, se constată un paralelism între materialul sănătos şi cel infectat în ceea ce priveşte activitatea lor. Din rezultatele obţinute cu extractele eterice totale din materialul recoltat în faza de înfrăţire (fig. 6 *A*) se remarcă următoarele : în cele 4 diluţii activitatea de stimulare este accentuată la proba care conţinea părţile bazale ale plantelor sănătoase. La extractele obţinute din plante fără partea bazală, probele infectate manifestă de data aceasta o activitate de slabă inhibare. În activitatea fracţiunilor separate cromatografic din extractele respective (fig. 6 *B*) se remarcă deosebiri semnificative numai în cazul probei de plante fără partea bazală, în sensul că spre deosebire de materialul infectat fracţiunile obţinute din materialul sănătos prezintă o activitate de stimulare ; aceste deosebiri se manifestă deci în acelaşi sens ca şi în cazul extractelor eterice totale.

★

Din rezultatele prezentate se constată că modificările induse de parazit la nivelul factorilor analizaţi de noi se diferenţiază în funcţie de faza în care se afla planta şi de organul analizat.

Modificările constatate la materialul analizat în faza de coleoptil, în ce priveşte atît aminoacizii cît şi activitatea biologică, conduc la concluzia că parazitul creează o stare de hiperauxinie ; mărirea activităţii de stimulare este corelată cu creşterile la nivelul triptofanului, precursor al derivaţilor indolil-acetici, şi de asemenea cu nivelul scăzut al tirozinei, precursor al numeroşilor compuşi fenolici care reglează cantitatea de auxine în ţesuturi.

Rezultatele obţinute la materialul analizat în faza de două frunze ne permit să stabilim o corelaţie între modificările apărute la nivelul aminoacizilor şi cele apărute la nivelul derivaţilor indolici. Astfel, la materialul infectat se constată o creştere generală a aminoacizilor la nivelul tuturor organelor. În ce priveşte derivaţii indolici, se constată prezenţa

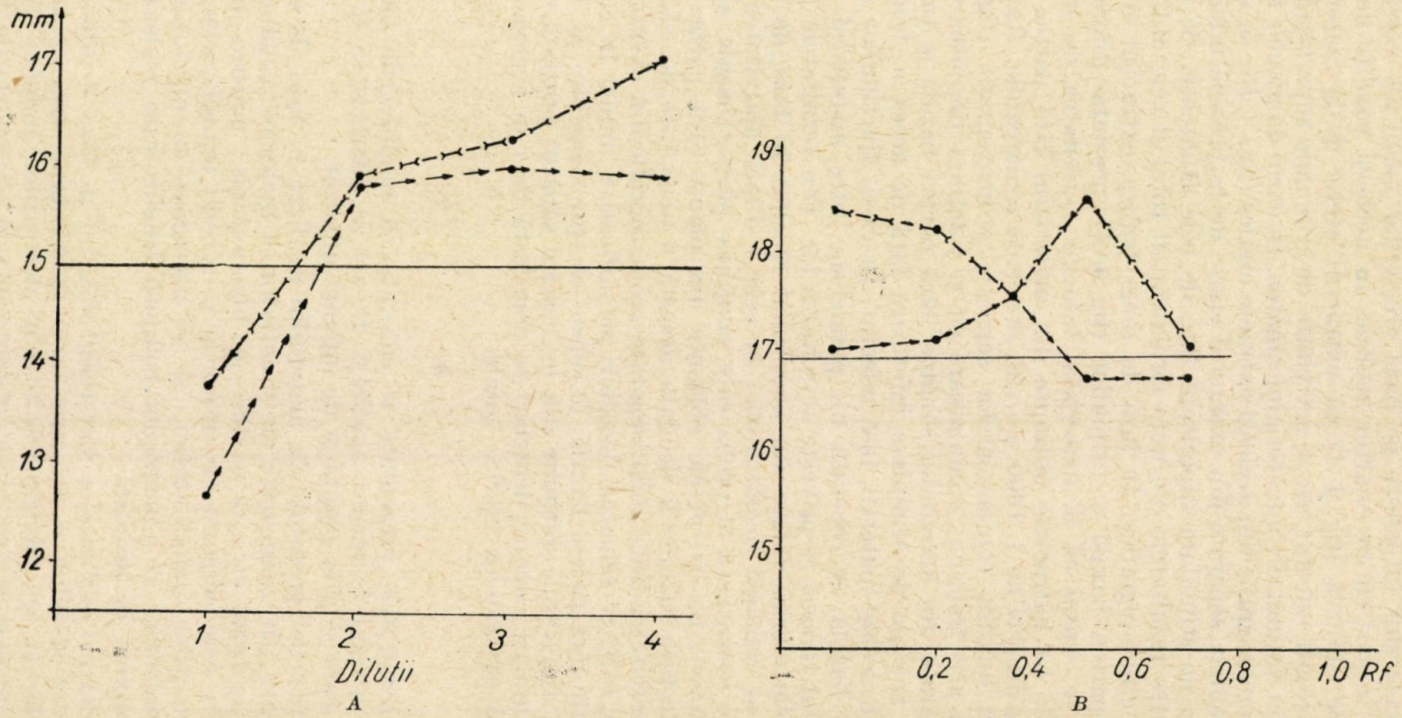


Fig. 4. — Variația conținutului în auxine în faza de coleoptil.

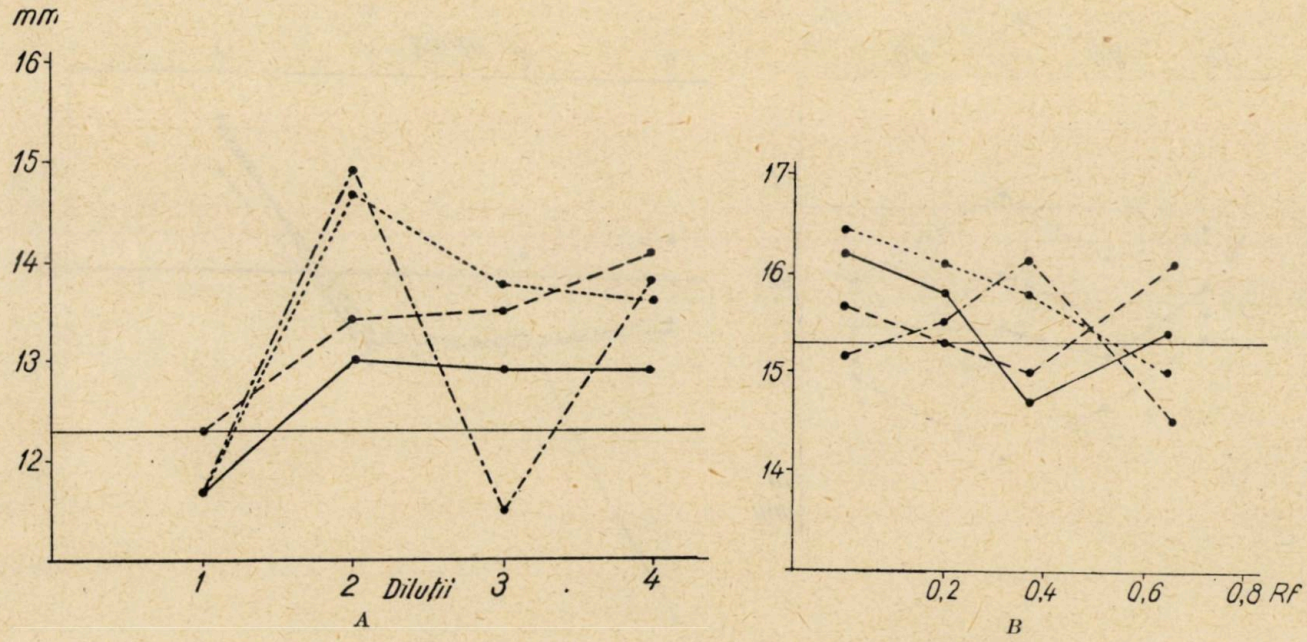


Fig. 5. — Variația conținutului în auxine în faza de două frunze.

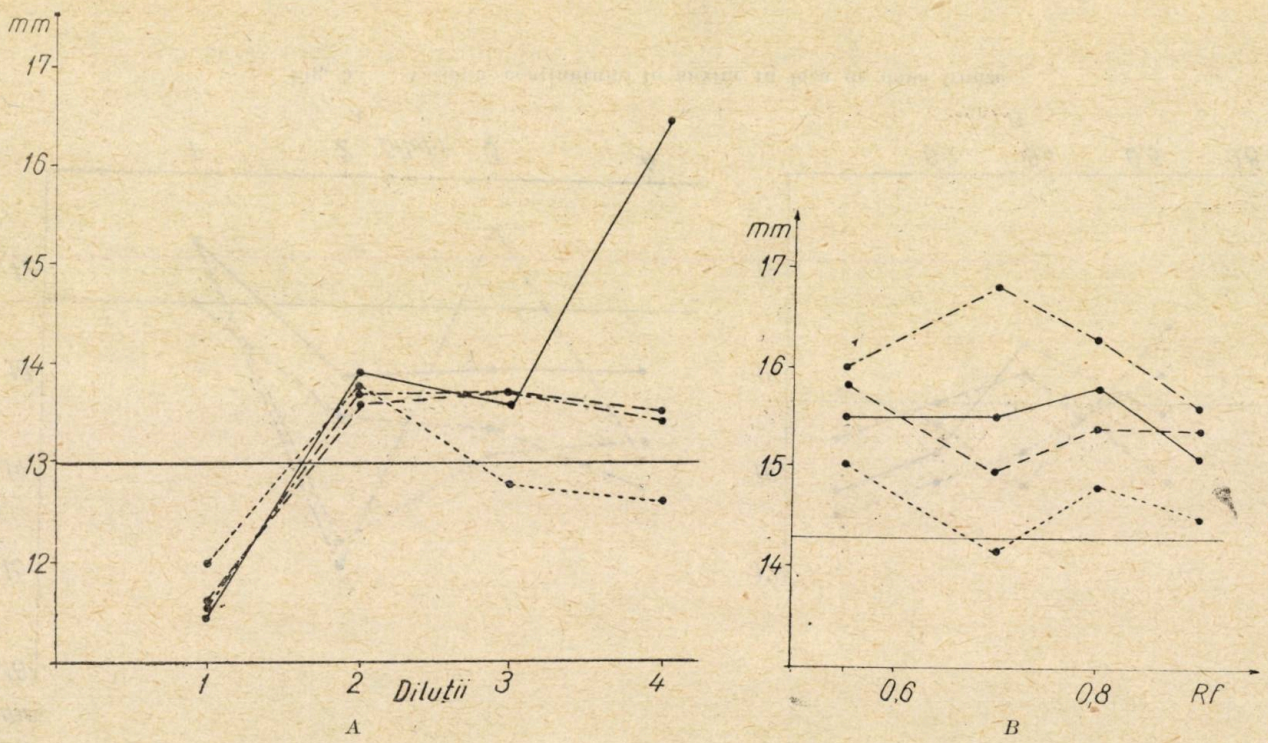


Fig. 6. — Variația conținutului în auxine în faza de înfrățire.

A — extract eteric, *B* — fracții separate cromatografic.

Pentru coleoptil : → → → → material de la plante sănătoase ;) — ( ) — ( ) — (material de la plante bolnave.

Pentru partea bazală a tulpinilor : ——— material de la plante sănătoase ; — — — — material de la plante bolnave.

Pentru frunze : — . — . — . material de la plante sănătoase ; ..... material de la plante bolnave.

în același extract a unor fracțiuni cu acțiune antagonistă, atît în materialul sănătos cît și în cel infectat.

Deosebirile relevate la nivelul aminoacizilor prin analiza probelor în stadiul de înfrățire la extractele obținute din plantele fără parte bazală, par să fie din nou corelate cu cele de la nivelul compușilor indolici, în sensul că materialul infectat este caracterizat printr-o scădere a triptofanului, paralelă cu scăderea activității de creștere.

Goodman și colab. [3] citează numeroase exemple de plante infectate cu ciuperci care manifestă hiperauxinie, ceea ce concordă cu cele obținute de noi la analiza probelor în faza de coleoptil. Modificările la nivelul triptofanului, fenilalaninei și tirozinei, precursori comuni ai substanțelor de creștere de tip indolic și ai inhibitorilor de tip fenolic, arată că au loc schimbări calitative importante ale metabolismului normal al acestor compuși.

Analizînd modificările morfologice induse de parazit, concretizate prin înfrățire abundentă și piticire accentuată, în paralel cu cele biochimice la nivelul factorilor studiați, reiese că starea de hiperauxinie instalată în faza de coleoptil este premergătoare înfrățirii. Aceasta este considerată ca o creștere haotică, consecință normală a perturbațiilor induse de parazit la nivelul regulatorilor de creștere.

Scăderea activității la nivelul compușilor de creștere în favoarea inhibitorilor, constatată la analiza probelor din stadiul de înfrățire, este o explicație a fenomenului de piticire.

CONCLUZII

1) Se observă o diferențiere la nivelul auxinelor și al aminoacizilor liberi în funcție de faza de dezvoltare a plantei gazdă și de organul analizat.

2) Înfrățirea abundentă a plantelor bolnave este o consecință a stării de hiperauxinie instalată în faza de coleoptil.

3) Fenomenul de piticire accentuată se datorește unei activități scăzute a componentelor cu activitate de creștere, instalată în faza de înfrățire.

Primită la redacție la 25 mai 1970

Secția de microbiologie și Fitopatologie
Institutul de Biologie „Tr. Săvulescu"
București.

BIBLIOGRAFIE

1. L. Dumitraș, Rev. Roum. Biol., sér. Bot., **10**, 429 (1965).
2. L. Sequeira, Ann. Rev. Phytopath., **1**, 5 (1963).
3. R. N. Goodman, Z. Király, M. Zaitlin, *The biochemistry and physiology of infectious plant disease*, D. van Nostrand Comp. Inc., Canada, Toronto, 1967.
4. V. Macko, A. Novacky, *Symp. Inst. für Phytopathologie*, Aschersleben 1964.
5. A. Novacky, V. Macko, Naturwissenschaften, **23**, 562 (1964).

6. E. NIEMANN, Z. Pflanzenbau Pflanzenschutz, **6**, 25 (1955).
7. T. A. BENNET-CLARK, N. P. KEFFORD, Nature, **171**, 645 (1953).
8. L. J. AUDUS, *Plant Growth Substances*, Interscience Publishers, Inc. New York, 1963.
9. I. M. HAÏS, K. MACEK, *Cromatografia pe hîrtie*, Editura tehnică (Traducere din limba cehă), Bucureşti, 1960.

BIOCHEMICAL MODIFICATIONS INDUCED IN WHEAT PLANTS INFECTED WITH *TILLETIA CONTROVERSA*

SUMMARY

The present results bring some contribution to the elucidation of parasite-host plant relationships in a more special case, in which wheat plants suffer important modifications under the influence of the parasite *Tilletia controversa*, manifested by abundant tillering and marked dwarfing.

The biochemical modifications induced by the parasite at the level of auxins free aminoacids are presented, as well as the differentiation of these modifications in terms in the phase of host plant development. It may be inferred that the abundant tillering of diseased plants derives from the condition of hyperauxinia established in the coleoptyl phase, while the pronounced dwarfing phenomenon would be due to a low activity of components with growth activity in favour of inhibitors, recorded in samples in the tillering phase.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 365 – 374 (1970)

HIDROLIZA ENZIMATICĂ A FRAGMENTULUI Fab DIN IMUNOGLOBULINA G DE IEPURE REALIZATĂ CU O FRACȚIUNE SUBCELULARĂ BOGATĂ ÎN CATEPSINE IZOLATĂ DIN FICATUL DE ȘOBOLAN

VICTOR GHEȚIE și CECILIA MOTAȘ

Rezumat. — Fragmentul Fab poate fi hidrolizat de catepsinele din ficat, cu condiția ruperii prealabile a legăturilor disulfidice care contribuie la menținerea configurației sale compacte.

Ruperea legăturii disulfidice interlanț (L — Fd) determină hidroliza a jumătate din cantitatea de Fab. Hidroliza întregii cantități poate fi realizată numai prin distrugerea structurii secundare a celor doi componenți, L și Fd, ai fragmentului Fab.

Se sugerează că în calea metabolică de distrugere a IgG trebuie să intervină reductaze capabile să producă în configurația fragmentului Fab modificări similare cu cele realizate *in vitro* prin mijloace chimice.

Experiențe anterioare au arătat că imunoglobulina G (IgG) de iepure poate fi scindată în fragmente de tip Fab, Fc, Fc′ și peptide, de către fracțiuni subcelulare izolate din ficat [1] și alte organe [2]—[4].

Cu o fracțiune subcelulară bogată în catepsina E, izolată din leucocite polimorfonucleare s-a putut realiza hidroliza completă a fragmentelor Fc și Fc′ [4], dar nu au putut fi găsite condiții experimentale în care să fie atacat, nici măcar parțial, fragmentul Fab [1].

În lucrarea prezentă s-a pornit de la ideea că fragmentul Fab poate fi catabolizat *in vivo* de către catepsinele intracelulare, numai cu concursul unor sisteme enzimatice care desfac în prealabil structura compactă a acestui fragment [1]. În consecință, am urmărit să dovedim că supunînd fragmentul Fab unor tratamente chimice care-i modifică configurația spațială, de o manieră care ar putea fi analogă cu cea care are loc *in vivo*, acesta devine susceptibil la acțiunea catepsinelor.

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea IgG și a fragmentului Fab (Fab′). IgG s-a obținut prin precipitarea unui amestec de seruri de iepure cu $(NH_4)_2SO_4$, la o concentrație de 40%, urmată de cromatografie pe DEAE-celuloză, la pH 8,0 în tampon fosfat 0,02 M. Fragmentul Fab s-a obținut prin hidroliza IgG cu papaină la pH 7,0. Hidrolizatul s-a dializat față de tampon fosfat, pH 7,0, 0,005 M

și s-au îndepărtat cristalele de Fc formate. Supernatantul s-a precipitat cu $(NH_4)_2SO_4$ 60% și precipitatul obținut s-a dializat față de tampon acetat, pH 5,5, 0,1 M. Dializatul s-a cromatografiat pe CM-celuloză, eluată tot cu tampon acetat, pH 5,5, 0,1 M. Piscul cromatografic neadsorbit conține fragmentul Fab. La imunoelectroforeză cu ser de capră antifragmente Fab + Fc de iepure, pe lîngă linia de precipitare intensă dată de Fab, se obține și o linie slabă, caracteristică pentru Fc, semn că acest fragment încă mai impurifică preparatul de Fab. Fragmentul Fab′ s-a obținut prin hidroliza IgG obținut din serul unui singur animal, cu pepsină, la pH 4,5, în tampon acetat o,1 M. Hidrolizatul a fost redus cu β-mercaptoetanol 0,2 M și apoi a fost cromatografiat peste o coloană de CM-celuloză, echilibrată cu tampon acetat pH 5,5, 0,01 M. S-a aplicat un gradient de concentrație discontinuă și s-a colectat fracțiunea care părăsește coloana cromatografică în intervalul de concentrație 0,05 — 0,1 M. Ea cuprinde fragmentul Fab′.

Radioiodurarea fragmentului Fab (Fab′). S-a utilizat tehnica de oxidare cu cloramină T, pornind de la o soluție de ^{131}INa 20 mCi/ml fără purtător [5]. Activitatea specifică a preparatelor de Fab (Fab′) radioiodurate a variat între 10 — 20 μCi/mg. Iodul nelegat a fost îndepărtat prin gel-filtrare (uneori repetată) pe Sephadex G - 25, cu NaCl 0,145 M. Cantitatea de iod liber din preparatele radioiodurate de Fab (Fab′) nu au depășit 2%.

Reducerea completă a fragmentului Fab. S-a utilizat tehnica recomandată de Freedman și Sela [6] pentru reducerea IgG. S-a făcut o soluție de Fab 10 mg/ml, ce conținea și Fab radioactiv, în tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 8,0 cu uree 10 M. S-a barbotat azot cîteva minute, s-a adăugat β-mercaptoetanol pînă la o concentrație de 0,3 M și s-a incubat sub atmosferă de azot, timp de 4 ore, la 37°C. S-a filtrat apoi amestecul peste o coloană de Sephadex G - 25 (50/1,7 cm), echilibrat cu acid acetic 0,1 N, și s-a recoltat primul pisc radioactiv care conținea Fab complet redus. Reoxidarea Fab complet redus s-a făcut pe o parte alicotă, înainte de filtrarea peste Sephadex G - 25, utilizînd tehnica recomandată de Freedman și Sela [5]. Randamentul reoxidării a fost în jur de 12%. Preparatul reoxidat reacționează cu serul de capră antifragmente Fab + Fc, formînd, pe lîngă linia Fab, o linie nouă în zona startului. Între cele două linii se observă o reacție de identitate parțială (vezi fig. 2).

Reducerea completă a fragmentului Fab′. S-a utilizat tehnica recomandată de Pery și Fougereau [7]. S-a făcut o soluție de Fab′ 2 mg/ml ce conținea și Fab′ radioactiv, în NaCl 0,1 M, cu uree 10 M. S-a barbotat azot cîteva minute, s-a adăugat β-mercaptoetanol pînă la 0,2 M și s-a incubat 4 ore la 37°C, sub o atmosferă de azot. Amestecul s-a filtrat apoi peste o coloană de Sephadex G - 25 (50/1,7 cm), echilibrat cu acid acetic 0,1 N. S-a recoltat primul pisc. Reoxidarea s-a făcut după Pery și Fougereau [7]. Randamentul reoxidării a fost în jur de 20 %.

Tratarea fragmentului Fab (Fab′) cu uree. S-au aplicat tehnicile de la reducerea completă a fragmentului Fab (Fab′), cu deosebire că s-a omis adăugarea de β - mercaptoetanol.

Reducerea și alchilarea fragmentului Fab. S-a utilizat tehnica recomandată de Fahey [8], cu diferența că pentru reducere s-a folosit o soluție de β - mercaptoetanol 0,3 M, și o concentrație egală de iodacetamidă.

Amestecul redus și alchilat s-a dializat 2 ore față de apă distilată și 24 ore față de acid acetic 0,1 N. Într-o altă experiență, în amestecul redus și alchilat s-a introdus uree pînă la o concentrație de 10 M și apoi s-a incubat la 37°C, timp de 4 ore, după care amestecul a fost gel-filtrat peste Sephadex G - 25, echilibrat cu acid acetic 0,1 N. Ca și în celelalte experiențe similare, s-a recoltat primul pisc.

Izolarea fracțiunii subcelulare bogate în lizozomi. S-a obținut un omogenat de ficat de șobolan în zaharoză 0,25 M, după un procedeu descris într-o altă lucrare [1]. S-a îndepărtat fracțiunea de 900 x g și apoi s-a centrifugat supernatantul la 21 500 x g, colectîndu-se fracțiunea depusă. Depozitul s-a omogenizat adăugînd o cantitate mică de tampon citrat 0,1 M, pH 2,5 sau 3,5, sau de acid acetic 0,1 N, astfel aleasă încît concentrația suspensiei, determinată prin tehnica Aldridge [9], să fie cuprinsă între 95 — 100 mg proteină/ml. Această suspensie a fost utilizată mai departe pentru hidroliza Fab.

Hidroliza Fab (Fab'). Amestecul, adus la un volum final de 1 ml, a fost alcătuit din: Fab neradioactiv și radioactiv 1 mg, cisteină 0,01 M, fracțiune subcelulară 20 mg proteină sau papaină 20 μg, acid acetic 0,1 N. S-au făcut probe din care s-au omis fie cisteina, fie fracțiunea subcelulară sau papaina. Ultimele două au fost utilizate ca probe martor. pH-ul amestecului de hidroliză cu fracțiunea subcelulară a fost 3,6, iar cu papaină 3,0. După o incubare de 16 ore la 37°C s-au centrifugat, numai probele cu fracțiunea subcelulară, iar în supernatante s-a determinat radioactivitatea totală și cea solubilă în acid tricloracetic 5%. Cu ajutorul acestor două valori s-a calculat cantitatea de radioactivitate eliberată în urma hidrolizei, care s-a exprimat în procente raportate la radioactivitatea totală a fragmentului supus hidrolizei. S-au corectat radioactivitățile citite cu valorile probelor martor care au variat între 3 — 8%, în funcție de tratamentul prealabil la care a fost supus fragmentul Fab.

Radioactivitatea fixată în fracțiunea subcelulară a fost extrasă cu un tampon TRIS-HCl, pH 8,0, 0,1 M, ce conținea 0,5% Triton X - 100. După o incubare de 30 min la temperatura camerei, amestecul a fost centrifugat și supernatantul a fost supus analizei. Măsurătorile radiometrice s-au făcut la un scintilator cu cristal cu puț [1].

Gel-filtrarea pe Sephadex G - 15. S-a utilizat o coloană de 35/0,6 cm, umplută cu Sephadex G - 15, echilibrat cu acid tricloracetic 1%. Coloana s-a încărcat cu 1 ml din supernatantul rezultat din precipitarea cu acid tricloracetic 10% a hidrolizatului de Fab complet redus cu fracțiunea subcelulară. S-a utilizat o viteză de 12 ml/oră și s-au recoltat probe de 2 ml, care au fost spectrofotometrate la 280 nm și apoi măsurate radiometric.

Imunoelectroforeza și imunodifuzia cantitativă. S-au utilizat plăci de 8 cm, acoperite cu gel de agaroză 1% în tampon barbital pH 8,6, avînd o putere ionică de 0,05 în cuvele electrozilor și 0,016 în plăci. Potențialul aplicat a fost de 2 V/cm, timp de 2 ore. S-a utilizat un ser de capră anti-fragmente Fab + Fc de iepure, obținut prin injectarea repetată a unui animal cu un hidrolizat de IgG papaină, la pH 5,5, ce conținea fragmentele

[1] Măsurătorile au fost efectuate sub controlul lui C. Vilău de la Institutul Oncologic, căruia îi mulțumim și pe această cale.

Fab, Fc și Fc′ [10]. Existența anticorpilor anti-(Fab + Fc) a fost dovedită cu ajutorul fragmentelor Fab și Fc pure.

Imunodifuzia cantitativă s-a efectuat după tehnica lui Fahey și McKelevy [11]. S-a utilizat o curbă etalon ridicată cu fragment Fab pur. S-a folosit serul de capră anti-fragmente (Fab + Fc) într-o diluție 1 : 33.

REZULTATE

Deoarece rezultatele publicate anterior [1] nu excludeau posibilitatea ca măcar o parte din fragmentul Fab să fi fost hidrolizat, am efectuat experiențe cu preparate purificate de Fab obținute dintr-un amestec de seruri și cu preparate de Fab′ provenite din serul unui singur animal. Rezultatele sînt prezentate în tabelele 1 și 2.

Tabela 1

Degradarea fragmentului Fab de către fracțiunea subcelulară bogată n catepsină, izolată din ficat și de către papaină*

Fab	Radioactivitate eliberată (% din radioactivitatea totală)		
	Fracțiunea subcelulară		Papaină
	Cu cisteină	Fără cisteină	
Nativ (netratat)	14	7	14
Redus și alchilat	50	33	56
Redus și alchilat plus uree	85	85	64
Uree	33	32	28
Redus complet	100	100	65
Reoxidat **	77	69	—

*Valorile sînt corectate cu radioactivitate eliberată în probele care n-au conținut fracțiunea subcelulară sau papaină

** Concentrația proteică 0,25 mg/ml, concentrația fracțiunii subcelulare 20 mg/ml și concentrația papainei 20 μg/ml. Pentru celelalte probe condițiile experimentale sînt indicate la metode.

Tabela 2

Degradarea fragmentului Fab′ de către fracțiunea subcelulară bogată în catepsine izolată din ficat și de către papaină *

Fab′	Radioactivitate eliberată (% din radioactivitatea totală)		
	Fracțiunea subcelulară		Papaină
	Cu cisteină	Fără cisteină	
Nativ (netratat)	27	17	27
Uree	57	45	49
Redus complet	100**	100	100
Reoxidat ***	64	34	65

* Valorile sînt corectate prin scăderea radioactivității eliberată în probele care n-au conținut fracțiunea subcelulară sau papaina.

** La pH 5,0 se eliberează 75% din radioactivitatea totală, iar la pH 8,0 numai 2%.

*** Concentrația proteică 0,15 mg/ml, concentrația fracțiunii subcelulare 14 mg/ml și concentrația papainei 5μg/ml. Pentru celelalte probe condițiile experimentale sînt indicate la metode.

Hidroliza cu papaină s-a făcut pentru control, cu scopul de a se înlătura suspiciunea că eliberarea de ^{131}I ar putea fi cauzată de acțiunea unor deiodaze prezente în fracțiunea subcelulară folosită. Tot pentru a întări gradul de confidență al rezultatelor, s-a procedat și la dozarea, prin imunodifuzie radială, a cantității de fragment Fab rămase nehidrolizată în probe. Rezultatele sînt prezentate în tabela 3.

Tabela 3

Cantitatea de Fab hidrolizată de către fracțiunea subcelulară și de către papaină, determinată prin imunodifuzie cantitativă

Fab *	Cantitatea hidrolizată (% din cantitatea inițială)		
	Fracțiunea subcelulară		Papaină
	Cu cisteină	Fără cisteină	
Nativ (netratat)	14	7	14
Redus și alchilat	48	10	24
Redus și alchilat plus uree	53	40	22
Uree	21	14	20

* Deoarece Fab complet redus nu mai reacționează cu antiserul utilizat, nu s-a putut determina cantitatea hidrolizată.

Compararea datelor cu cele din tabela 1 arată atît concordanțe bune cît și discrepanțe notabile. Deosebirile pot fi cauzate de faptul că prin măsurători de radioactivitate nu se determină cantitatea de proteină hidrolizată, valorile observate fiind numai proporționale, nu și egale cu cantitatea de Fab degradat.

Prezența peptidelor radioactive în hidrolizatul de Fab redus complet este o altă dovadă că acțiunea fracțiunii subcelulare asupra fragmentelor se realizează prin ruperea legăturilor peptidice, și nu prin deiodaze. O cantitate însemnată de radioactivitate se găsește în ultimul pisc, care nu prezintă absorbție la 280 nm, ceea ce sugerează că în cursul hidrolizei se eliberează și iod liber (figura 1).

Deoarece s-a constatat că atunci cînd Fab′ redus complet este supus hidrolizei cu fracțiunea subcelulară, o cantitate însemnată de radioactivitate rămîne atașată de această fracțiune (40%), s-a încercat eliberarea ei prin tratarea fracțiunii cu o soluție de Triton X - 100, 0,5%. S-a constatat că se extrage aproape 80% din radioactivitatea totală a fracțiunii; întreaga activitate extrasă este solubilă în acid tricloracetic. Acest rezultat arată că și partea din Fab redus complet, care se atașază de fracțiunea subcelulară, suferă o hidroliză completă.

Hidrolizatele de Fab și Fab′ cu fracțiunea subcelulară sau cu papaină au fost analizate imunoelectroforetic (figura 2).

În hidrolizatele obținute cu fracțiunea subcelulară nu s-au putut pune în evidență modificări notabile. Nu s-a constatat apariția unor noi linii de precipitare, iar linia de precipitare caracteristică pentru fragmentul Fab a apărut uneori mai difuză sau cu o tendință de scindare, mai mult în funcție de tratamentul prealabil căruia i-a fost supus fragmentul și de

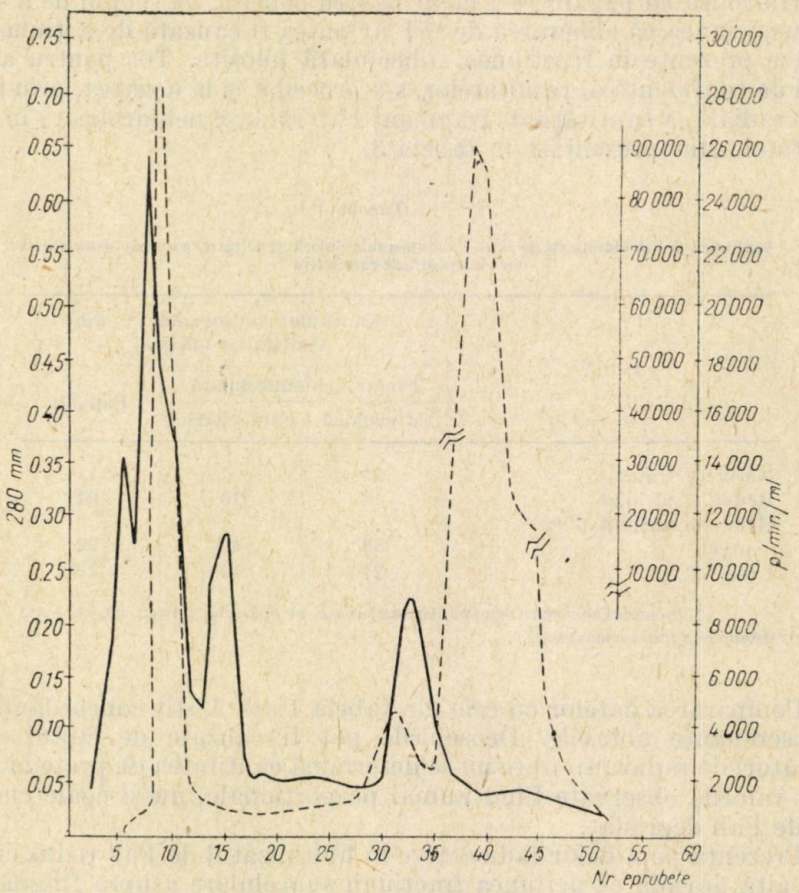


Fig. 1. — Gel-filtrare pe Sephadex G-15 a supernatantului rezultat prin precipitarea cu acid tricloracetic 10% a fragmentului Fab redus complet, hidrolizat cu fracțiunea subcelulară (— — — radioactivitate).

mediul în care s-a făcut incubarea, decît ca rezultat al acțiunii catepsinelor (figura 2).

O comportare deosebită s-a semnalat în cazul digestiei cu papaină. S-a constatat apariția unei linii de precipitare noi în regiunea catodică a plăcii indiferent dacă fragmentul Fab a fost supus s-au nu unui tratament preliminar. Este interesant de observat că linia este prezentă și în preparatul de Fab complet redus, deși acesta nu mai reacționează cu serul imun (figura 2 (*2—8*). Linia apare atît la hidroliza fragmentului Fab cît și a fragmentului Fab' și nu prezintă radioactivitate. Linia este dată de anticorpii anti-papaină prezenți în antiser și papaina din hidrolizat.

DISCUȚII

Procentul mic al degradării fragmentului Fab confirmă concluziile anterioare [1], [4] privitoare la rezistența acestui fragment la atacul enzimatic. O parte din acest procent poate reveni impurităților de Fc prezente

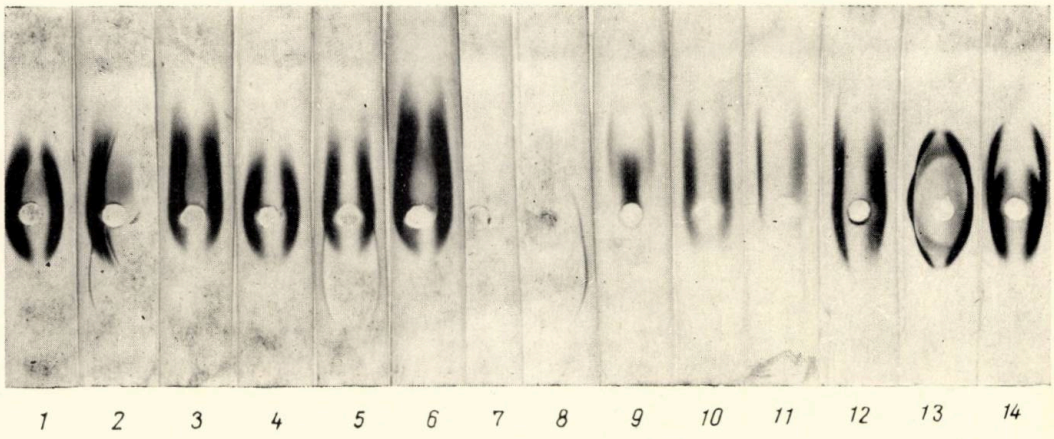


Fig. 2 — Analiza imunoelectroforetică a fragmentului Fab şi Fab′ incubat cu fracţiunea subcelulară sau cu papainã.

1. Fab′ netratat incubat cu fracţiunea subcelulară ; 2. Fab′ netratat incubat cu papainã ; 3. Fab′ netratat incubat fără enzimă (martor) ; 4. Fab′ tratat cu uree incubat cu fracţiunea subcelulară ; 5. Fab′ tratat cu uree incubat cu papainã ; 6. Fab′ tratat cu uree incubat fără enzimă (martor) ; 7. Fab′ redus complet incubat cu fracţiunea subcelulară ; 8. Fab′ redus complet incubat cu papainã ; 9. Fab′ redus complet incubat fără enzimă (martor) ; 10. Fab redus şi alchilat + uree incubat cu fracţiunea subcelulară ; 11. Fab redus şi alchilat + uree incubat cu papainã ; 12. Fab redus şi alchilat + uree incubat fără enzimă ; 13. Fab nativ (netratat) ; 14. Fab reoxidat.

în preparatul nostru de Fab. Degradarea unei cantități mai mari de Fab' decît de Fab poate fi rezultatul desprinderii unor peptide radioactive din regiunea C-terminală a fragmentului Fd' [12], și nu al susceptibilității crescute a fragmentului Fab'.

Reducerea și alchilarea fragmentului Fab, în condițiile noastre de lucru, nu produce decît ruperea legăturii disulfidice L-Fd fără a afecta notabil legăturile intralanț. De aceea, se poate presupune că în moleculă nu au loc rearanjamente care să ducă la modificarea structurii compacte a acestui fragment. Cu toate acestea, jumătate din cantitatea de Fab este hidrolizată (tabela 1 și 3), ceea ce arată că reducerea legăturii disulfidice L-Fd poate determina o rearanjare conformațională a fragmentului Fab la un pH deasupra lui 2,0 [13]. Legătura disulfidică L-Fd apare într-adevăr ca o ancoră care permite apoziția aminoacizilor cheie expuși la ambele capete, ca rezultat al plierii lor specifice, controlate de legăturile disulfidice intralanț [14]. Deosebirea dintre rezultatele obținute prin măsurarea eliberării radioiodului și cele obținute prin determinarea cantității de Fab rămase nehidrolizată se poate explica prin hidroliza inegală a lanțului L și a fragmentului Fd. O eliberare de 50% radioiod poate însemna că aproximativ jumătate din Fab a fost complect hidrolizat, sau că întreaga cantitate de lanț L sau de fragment Fd a fost hidrolizată în urma desfacerii celor doi componenți unul de celălalt. Dacă componentul care se păstrează reacționează, cu antiserul folosit de noi, altfel decît fragmentul Fab, atunci diametrele inelelor de precipitare introduse în curba etalon obținută cu fragment Fab nu mai dau valori reale care să măsoare cantitatea de fragment Fab rămasă neatacată.

Ureea acționează asupra structurii secundare a lanțului L și a fragmentului Fd, însă deplierea moleculei nu este completă, deoarece rămîn intacte legăturile disulfidice inter- și intralanț. Prin dializa față de acid acetic 0,1 N, molecula tinde să rămînă în această formă parțial depliată. Astfel, Gyenes și colab. [15] au constatat că îndepărtarea ureei poate să nu determine reagregarea unor fragmente provenite din Fab, cu condiția ca ele să fie dializate față de un tampon cu un pH scăzut. De asemenea, ionul acetic interacționează puternic cu proteinele și favorizează disocierea lor la un pH acid [16].

Modificarea conformației fragmentului Fab în urma tratamentului cu uree descoperă grupări care, în stare nativă, sînt ascunse, și le expune atacului catepsinei. Hidroliza Fab' este considerabil mai mare decît aceea a fragmentului Fab, și acest lucru se poate datora împrejurării că Fab' este mai omogen, provenind din serul unui singur animal. De asemenea, nu este exclus ca Fab' să prezinte anumite particularități structurale care să determine agregarea sa, în urma tratamentului cu uree, prin oxidarea grupării sulfhidrilice din capătul C—terminal al fragmentului Fd' [17]. Agregarea ar putea induce o susceptibilitate mai crescută la acțiunea enzimelor proteolitice, printr-un mecanism asemănător celui produs de denaturarea prin căldură.

Tratarea cu uree a fragmentului Fab ce nu mai posedă legătură disulfidică interlanț mărește susceptibilitatea fragmentului la atacul enzimatic, fără a putea totuși determina hidroliza sa completă. Acest lucru poate fi realizat numai prin reducerea completă a fragmentului, în condiții în care se desfac și legăturile disulfidice intralanț, iar molecula este complet

depliată. Este evident că în acest caz fragmentul Fab nu numai că-și pierde structura sa compactă, dar chiar lanțul L și fragmentul Fd (Fd') au structura lor secundară și terțiară complet dezorganizată [18], [19].

Prin reoxidarea grupărilor sulfhidrilice, molecula de Fab refăcută își recapătă rezistența la acțiunea enzimelor proteolitice, semn că structura ei compactă a fost reformată. Faptul că moleculele reoxidate sînt hidrolizate într-o măsură mai însemnată decît cele native arată că numai o parte din ele sînt corect refăcute [20].

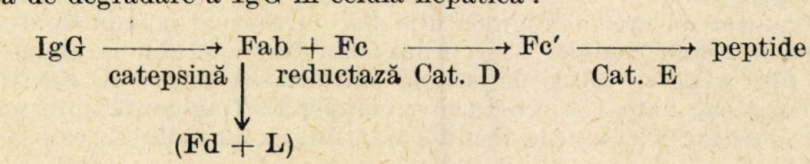
Influența pe care cisteina o are asupra hidrolizei apare notabilă în acele cazuri, în care ea o poate exercita direct asupra substratului, inducînd în acesta modificări de conformație care îl predispun la atacul enzimatic. Această comportare confirmă ideea, exprimată într-o altă lucrare [1], că cisteina nu „activează" catepsinele ci substratul. Cu toate acestea, nu poate fi exclusă intervenția asupra Fab a catepsinei B, prezente în fracțiunea subcelulară [21], și a cărei activitate este dependentă de prezența cisteinei.

Hidroliza cu papaină confirmă, în linii generale, rezultatele obținute cu fracțiunea lizozomală. Valorile observate sînt influențate de raportul enzimă/fragment Fab. De aceea, cu excepția Fab reoxidat, s-au folosit condiții experimentale pe cît posibil identice. Este util să arătăm că raporturile enzimă/fragment Fab folosite au fost astfel alese încît în probe să existe un exces de enzimă.

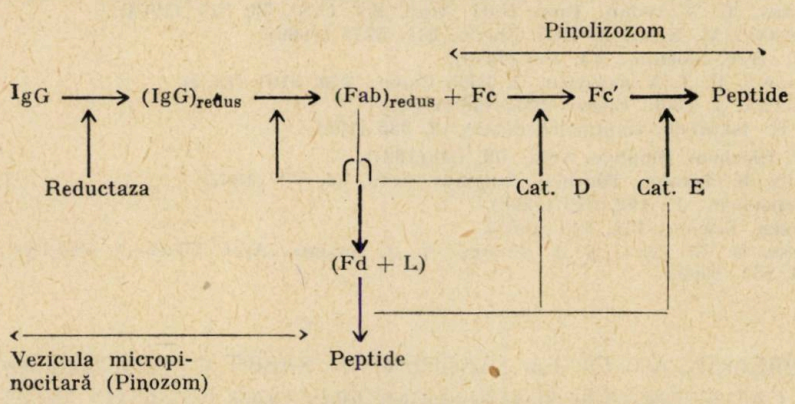
Rezultatele obținute sugerează că pentru hidroliza completă a IgG este necesară slăbirea structurii compacte a celor două regiuni Fab și Fc din moleculă. Dacă pentru regiunea Fc acest lucru se realizează prin scăderea pH-ului sub 5, pentru regiunea Fab este necesară ruperea legăturilor disulfidice interlanț și, probabil, și intralanț. Această rupere poate fi realizată, în celulă, prin intervenția unui sistem reductazic analog cu cel care provoacă desfacerea lanțurilor insulinei [22], [23], sau a subunităților din IgM [24].

Intervenția unui sistem reductazic ar explica acele rezultate, care au arătat că degradarea extensivă a unor proteine are loc prin adăugarea unor substanțe donatoare de energie [25], [26]. Cum în aceste experiențe autorii au lucrat cu preparate subcelulare bogate în lizozomi și mitocondrii, este probabil că substanțele donatoare de energie au determinat intrarea în funcție a sistemului reductazic endergonic, care a asigurat o deplasare a echilibrului conformațional spre starea depliată a proteinei, susceptibilă la acțiunea catepsinelor prezente în fracțiunea subcelulară. Această explicație pare cu atît mai plauzibilă, cu cît rămîne de neînțeles calea prin care un sistem donator de energie, compus din CoA + ATP [25] sau NADH + + GSH [27] poate interveni într-un proces hidrolitic exergonic, cum este cel ce determină hidroliza proteinelor.

În lumina acestor considerații, pare posibil să se schițeze calea metabolică de degradare a IgG în celula hepatică :



Această succesiune de evenimente catabolice nu se potrivește însă cu concepția curentă asupra fenomenului de endocitoză care, probabil, stă la baza captării IgG de către celulele hepatice [28]. Încorporarea moleculelor de IgG în celula hepatică se realizează prin intermediul veziculelor micropinocitare (pinozomi), a căror suprafață internă nu reprezintă altceva decît o porțiune din membrana celulară. Hidroliza proteinelor (IgG) are loc după fuziunea lizozomilor primari cu pinozomii (pinolizozomi), cînd se realizează un contact nemijlocit între catepsinele lizozomale și proteinele substrat. Dacă în acest loc se petrece desfacerea moleculei de IgG pînă la nivelul fragmentului Fab (fragmentul Fc fiind complet hidrolizat), rămîne greu de înțeles cum intervine sistemul reductazic, știut fiind că acesta nu se găsește în lizozomi. Cum în membra celulară există sisteme reductazice [29], apare posibil ca membrana veziculei micropinocitare să participe mai activ la procesul catabolic decît se crede. Numai că în acest caz nu este exclus ca procesele reductive să aibă loc înaintea celor hidrolitice și moleculele de IgG să sufere un proces de reducere a legăturii disulfidice interlanțuri încă din clipa în care sînt incluse în vezicură. În această alternativă, procesul degradării intracelulare a IgG poate fi astfel figurat :



Schema căii metabolice de degradare a IgG în celulă.

Deoarece reducerea lanțurilor disulfidice nu este suficientă pentru ca întreaga cantitate de fragment Fab să fie hidrolizată, ci este necesar ca cele două lanțuri componente ale fragmentului Fab să-și modifice și configurația, prin depliere, se poate presupune că această condiție se realizează prin fixarea lanțurilor depliate de proteinele din peretele pinolizozomilor, prin intermediul grupărilor — SH eliberate. Se poate realiza o adsorbție în strat monomolecular a lanțurilor, pe peretele fracțiunii subcelulare, și sub această formă ele pot să fie complet distruse de catepsine.

CONCLUZII

Catepsinele din ficat sînt capabile să atace și să degradeze fragmentul Fab, cu condiția scindării prealabile a legăturilor disulfidice care contribuie la menținerea structurii compacte a acestui fragment.

Prezentat la redacție la 30 iunie 1970

Laboratorul de imunochimie 1,
Institutul de biochimie București

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheție , C. Motaș, Immunochemistry, 1971 (sub tipar).
2. C. Motaș, V. Gheție, Immunochemistry, **6**, 547 (1969).
3. V. Gheție C. Medeșan, Rev. roum. Biochim., **6**, 117 (1969).
4. V. Gheție, A. Sulica, Immunochemistry, **7**, 175 (1970).
5. W. M. Hunter, F. C. Greenwood, Nature, **194**, 495 (1962).
6. M. H. Freedman, M. Sela, J. Biol. Chem., **241**, 2383 (1966).
7. P. Pery, M. Fougereau, Bull. Soc. Chim. Biol., **50**, 1023 (1968).
8. J. L. Fahey, J. Immunol., **91**, 448 (1963).
9. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
10. V. Gheție, C. Motaș, S. Mihăescu, Rev. roum. Biochim., **6**, 29 (1969).
11. J. L. Fahey, E. M. Mckelevy, J. Immunol., **94**, 84 (1965).
12. R. Heymer, Immunochemistry, **3**, 81 (1966).
13. L. V. Abaturov, R. S. Nezlin, T. I. Vengerova, Ja. M. Varshavsky, Biochim. Biophys. Acta, **194**, 386 (1969).
14. D. R. Stanworth, G. I. Pardoe, în D. N. Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell-Oxford, Edinburgh, 1967, p. 134.
15. L. Gyenes, J. E. Bata, A. H. Sehon, Immunochemistry, **3**, 251 (1966).
16. E. Chiancone, G. A. Gilbert, J. Biol. Chem., **240**, 3866 (1965).
17. C. I. Luks, G. E. Connell, Canad., J. Biochem., **46**, 961 (1968).
18. E. Haber, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., **52**, 1099 (1964).
19. P. L. Whitney, C. Tanford, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **53**, 524 (1964).
20. H. M. Freedman, M. Sela, J. Biol. Chem., **241**, 5225 (1966).
21. C. Motaș, St. cerc. biochim., **13**, 169 (1970).
22. H. H. Tomizawa, P. T. Varandani, J. Biol. Chem., **240**, 3191 (1965).
23. H. H. Tomizawa, J. Biol., Chem., **237**, 428 (1962).
24. A. Micheli, H. Islikler, Immunochemistry, **3**, 385 (1966).
25. N. W. Penn, Biochem. Biophys. Acta., **53**, 490 (1961).
26. W. L. Beeken, K. Imredy, Biochem. Biophys. Acta, **62**, 579 (1962).
27. S. Skrede, Biochem. J., **108**, 693 (1968).
28. H. J. P. Ryser, Science, **159**, 390 (1968).
29. R. R. Strauss, B. B. Paul, A. A. Jakobs, A. J. Sbarra, Arch. Biochem. Biophys., **135**, 265 1969).

ENZYMATIC BREAKDOWN OF Fab FRAGMENT IN RABBIT IMMUNOGLOBULIN G BY A CATHEPSIN-RICH SUBCELLULAR FRACTION ISOLATED FROM RAT LIVER

SUMMARY

Fab fragment can be broken down by liver cathepsins provided that disulphide bonds which maintain its packed configuration be previously cleaved.

The cleavage of interchain disulphide bonds (L—Fd) induces hydrolysis of a half of Fab amount. The breakdown of the whole amount can be achieved only after destruction of the secondary structure of L and Fd components which constitute the Fab fragment.

It is suggested that some reductases might be involved in the metabolic pathway leading to IgG breakdown; this opinion is based on the idea that these enzymes can induce some configurational alterations in Fab fragment similar to those obtained *in vitro* by chemical means.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 375 – 379 (1970)

STUDIUL BIOCHIMIC AL HIBRIZILOR. II. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A FRUCTELOR DE MĂR „FRUMOS DE VOINEȘTI", COMPARATIV CU GENITORII

ELENA ILIESCU

Rezumat. — Timp de 7 ani s-a urmărit compoziția chimică a fructelor hibridului de măr „Frumos de Voinești", comparativ cu genitorii săi Jonathan (♀) și Belle de Boskoop (♂). S-a constatat că aceasta este foarte apropiată de a genitorului matern, atît ca valori absolute, cît și în privința coeficienților mari de variație a diferitelor componente.

Fructele hibridului au avut : aciditatea și oxidabilitatea cu $KMnO_4$ mai mici decît a unuia sau ambilor genitori, iar proporția de azot proteic din total mai mare decît la ambii genitori ; coeficienții de variație a compoziției chimice mai mari chiar decît la soiul matern ; în sămînța fructului la maturitatea deplină fracțiunile izoperoxidazice identice cu ale soiului matern, în plus una nouă, inexistentă la genitori.

În căutarea unor soiuri de pomi cu însușiri biologice mai bune, în țara noastră s-au organizat numeroase experiențe de ameliorare a soiurilor existente, obținîndu-se mulți hibrizi valoroși. Unul dintre aceștia este și soiul de măr „Frumos de Voinești", omologat în 1966, obținut în anul 1953 în cadrul laboratorului de biologie al Stațiunii experimentale pomicole Voinești, jud. Dîmbovița, prin încrucișarea soiurilor Jonathan (♀) cu Belle de Boskoop (♂).

Concomitent cu studiile de biologie [4], în laboratorul de biochimie s-a urmărit calitatea fructelor hibridului, comparativ cu a fructelor soiurilor genitoare.

MATERIAL ȘI METODE

Fructele s-au analizat între anii 1961 și 1968 (exclusiv 1967), cînd producția hibridului putea fi considerată aproape stabilizată (prima fructificare a avut loc în anul 1958). Analiza s-a efectuat în momentul maturității de consum (apreciată de laboratorul de biologie), determinîndu-se : apa (g%) (substanța uscată reprezintă diferența pînă la 100), zahărul (glucoză — g%), aciditatea (g acid malic %), taninurile și vitamina C (mg%), cenușa (g%) și alcalinitatea ei (ml NaOH N%), oxidabilitatea cu iod și cu permanganat de potasiu (ml 0,1 N%). S-au calculat raportul zahăr/aciditate și alcalinitatea per g cenușă. Metodele

de analiză sînt descrise în [6], proba medie fiind alcătuită din 12 fructe reprezentative. Oxidabilitatea cu iod s-a determinat prin titrarea cu tiosulfat a excesului de iod liber dintr-o soluție măsurată adăugată extractului de analizat; oxidabilitatea cu $KMnO_4$ s-a determinat prin titrare directă, în prezența indicatorului indigocarmin. Ultima reprezintă diferența dintre oxidabilitatea totală cu $KMnO_4$ și cea cu iod. Din fructele anului 1968 s-au dozat formele de azot total (metoda Kjeldahl), proteic (Kjeldahl, cu precipitare în prealabil după Barnstein) și aminic (Van Slyke), calculîndu-se procentul de N proteic din total și de N aminic din proteic. Din sămînța fructelor, degresată în prealabil cu eter etilic (extracție Soxhlet), s-au determinat electroforetic fracțiunile peroxidazice [1]. Notările benzilor cu litere ale alfabetului latin sînt convenționale și ne aparțin.

Rezultatele obținute în urma analizelor chimice din 7 ani s-au prelucrat statistic [7].

Condițiile de cultură a pomilor au fost comparabile.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

După datele compoziției chimice (media pe 7 ani) (tabela 1), fructele genitorilor se deosebesc destul de mult. Deși soiul Belle de Boskoop are fructe mai puțin aspectuoase și cu gust mai acru și mai astringent decît Jonathan, el asimilează în acestea mai multă substanță uscată, zahăr, vitamină C, substanțe minerale, cu diferențe semnificative și foarte semnificative. Hibridul Frumos de Voinești are compoziția chimică a fructelor foarte apropiată de genitorul matern. Astfel, conținutul de substanță uscată este aproape identic, ca și cel de zahăr, tanin și vitamină C, sau alcalinitatea cenușei; numai aciditatea fructelor hibridului este distinct și foarte semnificativ mai mică.

Substanțele energetice exprimate prin oxidabilitatea lor cu iod (potențial mai scăzut) și cu permanganat (potențial mai ridicat) (tabela 1)

Tabela 1

Compoziția chimică a fructelor (1), coeficientul de variație a acesteia (2) și semnificația diferențelor hibridului față de genitori (3)

	Jonathan ♀			Frumos de Voinești		Belle de Boskoop ♂		
	1	2	3	1	2	1	2	3
Substanță uscată	15,63	6,65	—	15,87	12,63	19,07	7,90	00
Zahăr total	10,28	8,25	—	10,62	11,67	12,27	8,40	0
Aciditate	0,46	19,56	00	0,31	28,80	0,91	9,97	000
Taninuri	75,63	20,49	—	79,32	21,09	141,45	16,43	—
Vitamină C	2,85	50,47	—	2,43	47,27	7,96	82,43	0
Cenușă	0,19	22,47	—	0,19	43,21	0,24	22,46	—
Alcalinitatea cenușei	3,03	29,04	—	3,11	35,75	3,85	6,68	—
Alcalinitate/g cenușă	15,80	33,35	—	17,01	25,62	16,71	25,69	—
Zahăr/aciditate	22,61	11,54	× × ×	36,12	21,51	13,55	8,14	xx
Oxidabilitate cu I_2	14,96	40,02	—	15,46	26,37	18,25	16,82	—
Oxidabilitate cu $KMnO_4$	13,64	45,41	—	11,26	33,13	25,22	24,67	00

se găsesc în cantitate sensibil mai mare la genitorul patern decît la cel matern. Hibridul este apropiat tot de genitorul matern, cu o valoare mai mică distinct semnificativă față de genitorul patern.

Coeficienții de variație a compoziției chimice (tabela 2) arată o

Tabela 2

Conținutul formelor de azot în fructe (mg%)

	N total	N proteic	N aminic	N_p $\%N_t$	N_a $\%N_p$
Jonathan (♀)	28,3	8,0	4,7	28,26	58,75
Frumos de Voinești	27,4	14,0	3,2	54,01	21,62
Belle de Boskoop (♂)	59,5	31,2	24,3	52,44	77,88

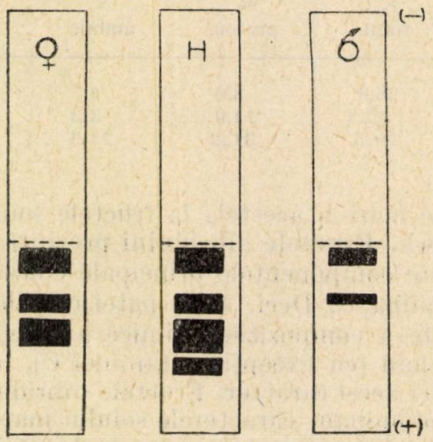
instabilitate destul de mare a acesteia la fructele soiului matern față de cele ale soiului patern. Fructele hibridului prezintă o instabilitate încă mai mare pentru toate componentele principale considerate, cu o ușoară excepție pentru vitamina C. Deci, soiul patern Belle de Boskoop, care manifestă o stabilitate a compoziției chimice a fructelor net superioară soiului matern Jonathan (cu excepția vitaminei C), n-a imprimat de loc fructelor hibridului nici acest caracter. Fructele hibridului Frumos de Voinești au moștenit predominant caracterele soiului matern. La o concluzie asemănătoare a ajuns și Leonov [4], care, în lucrările sale îndelungate asupra hibrizilor de măr, a constatat că aceștia moștenesc, de regulă, predominant caracterele plantelor materne.

Datele comparative ale conținutului de N total, proteic și aminic în fructele recoltei anului 1968 arată aceeași diferențiere mare între soiurile Jonathan și Belle de Boskoop, primul fiind mai sărac în azot (tabela 3). Fructele soiului patern conțin o cantitate dublă de azot total, din care de 4 ori mai mult azot proteic și de 5 ori mai mult azot aminic (aminoacizi liberi) decît acelea ale soiului matern. Corespunzător, procentele de N proteic din total, respectiv de N aminic din proteic, sînt și ele mult mai mari. Fructele soiului hibrid se apropie de soiul matern în privința valorilor absolute ale conținutului de N. Dar metabolizarea acestuia arată abateri mari față de ambii genitori : proporția de N proteic din cel total este mai mare chiar decît la genitorul patern, iar cea de N aminic din cel proteic reprezintă abia 37 % din cea găsită la genitorul matern. Reiese că metabolismul organismului hibrid este mai eficient, cantitatea de N fiind încorporată în majoritate în proteine, molecule cu înalte funcțiuni fiziologice. Această stare de fapt am găsit-o la majoritatea hibrizilor studiați [2] și ne permite să presupunem că una din manifestările zdruncinării eredității prin încrucișarea a două soiuri este și această metabolizare a azotului.

Tot în cadrul studiului de genetică biochimică a hibridului s-au determinat electroforetic fracțiunile proteice cu activitate peroxidazică în sămînță, la maturitatea deplină a fructului. Spectrul izoperoxidazelor arată, în acest moment, existența doar a fracțiunilor anodice, electronegative. Genitorul matern prezintă trei benzi, ce corespund la trei izo-

peroxidaze, notate de noi *a*, *b* şi *c*. Genitorul patern are prezente numai două fracţiuni, *a* şi *b*, cantitativ vădit mai slabe. La hibrid se constată prezenţa celor trei izoperoxidaze ale genitorului matern, din care fracţiunea *c* mai accentuată, şi încă una *d*, cu coeficientul de migrare cel mai ridicat. Această fracţiune nouă poate fi o proteină hibridă, care poate ilustra şi ea (printre altele) proprietăţi noi ale metabolismului hibridului.

Aminoacizii liberi determinaţi în pulpa fructelor, într-o lucrare an-



Spectrul electroforetic al izoperoxidazelor din sămînţa fructelor.

terioară [3], au arătat o situaţie asemănătoare cu cea a studiului electroforetic. Soiul matern a conţinut numai 6 aminoacizi : asparagina, acidul aspartic, serina, treonina, glicocolul şi alanina. Soiul patern, pe lîngă aceştia, a mai conţinut şi cisteina şi cistina. Hibridul a conţinut toţi aminoacizii soiului matern, în plus acidul γ-aminobutiric, inexistent la ambii genitori. Spectrul aminoacizilor din sămînţa hibridului a fost identic cu al soiului matern.

Soiul patern Belle de Boskoop nu a manifestat o influenţă pozitivă asupra fructelor, ci numai asupra pomului (de exemplu rezistenţa frunzişului hibridului la unele boli criptogamice) [5], pe cînd soiul matern a influenţat fructele în privinţa atît a aspectului, cît şi a însuşirilor organoleptice şi compoziţiei chimice. Dată fiind instabilitatea compoziţiei chimice a fructelor hibridului şi marea stabilitate a celor ale genitorului patern, poate n-ar fi lipsită de interes o nouă încrucişare a acestuia cu soiul Belle de Boskoop :posibilitatea unei eventuale influenţe a ultimului este mărită de ereditarea zdruncinată a hibridului.

CONCLUZII

Fructele hibridului „Frumos de Voineşti" au moştenit preponderent caracterele soiului matern Jonathan, fapt explicabil prin aportul genetic însumat nuclear şi citoplasmatic al acestuia. Cazul acidităţii şi oxida-

bilității cu permanganat de potasiu, care în fructele hibridului au valori mai mici, decît ambii, respectiv unul din genitori, sau al proporției de azot proteic din total, cu valoarea mai mare decît la ambii genitori, ca și instabilitatea compoziției chimice, mai mare chiar decît a soiului matern, sînt — desigur — rezultatul unui efect de zdruncinare a eredității. Faptul este atestat și de apariția, la hibrid, a unei fracțiuni izoperoxidazice noi în sămînță, care nu se găsește la genitori.

Prezentat la redacție la 20 octombrie 1969

Institutul de cercetări pentru pomicultură
Stațiunea experimentală pomicolă Voinești
Județul Dîmbovița.

BIBLIOGRAFIE

1. Brad I., Hurduc N., Nicolescu St., Marcu Z., St. cerc. biochim. **11**, 117 (1968).
2. Iliescu Elena, Rev. Hortic. Vitic., *11*, 71—75 (1969).
3. Iliescu Elena, Stud. Cercet. Biol., ser. Biol. veg., *1* (1970).
4. Leonov I. M., Sel.-hoz. Biol., **3**, 311—313 (1968); (H. A., 1968, **38** — 6976).
Pomologia R.P.R., vol. 8, Ed. Acad. R.P.R., București, 1969.
6. Radu I. F., Pandele I., Enăchescu G., *Proprietățile fiziochimice și tehnologice ale fructelor principalelor specii pomicole cultivate în R.P.R.*, Ed. Acad. R.P.R., București, 1957.
7. Săulescu N. A., Săulescu N. N., *Cîmpul de experiență*, Ed. Agro-Silvică, București, 1967.

THE BIOCHEMICAL STUDY OF HYBRIDS .II. CHEMICAL COMPOSITION OF FRUITS OF APPLE HYBRID „FRUMOS DE VOINEȘTI", AS COMPARED TO PARENTS

SUMMARY

The chemical composition of the apple hybrid's fruits „Frumos de Voinești" has been studied for 7 years, as compared to that of parents, Jonathan (♀) and Belle de Boskoop (♂). It was very similar to that of the maternal parent.

The hybrid fruits had lower acidity and oxidability with $KMnO_4$ than one or two of the genitors, but greater percentage of protein nitrogen than both parents. They also had a greater chemical instability than the maternal parent; in seeds of mature fruits isoperoxidase fractions were similar to those in the maternal sort, however, a new one which did not exist in parents also occurred.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 381 – 387 (1970)

ASPECTELE METABOLISMULUI METIONINEI S^{35} ŞI SELENOMETIONINEI Se^{75} LA ŞOBOLANI

II. STUDIUL COMPARATIV AL CAPTĂRII ŞI ÎNCORPORĂRII METIONINEI S^{35} ŞI SELENOMETIONINEI Se^{75} LA ŞOBOLANI ALBI, IRADIAŢI CU RAZE X

VALERIA KOVÁCS

Rezumat. — S-a studiat comparativ captarea şi încorporarea metioninei S^{35} şi selenometioninei Se^{75} în ficat, splină, rinichi şi în proteinele acestor organe, la şobolani albi iradiaţi cu raze X în dozele 200 r, 500 r şi 800 r.

S-a stabilit că după 24 ore de la iradiere are loc creşterea captării şi încorporării S^{35} atît în ficatul întreg cît şi în proteinele hepatice, iar în cazul Se^{75} are loc în condiţii identice o scădere a acestor procese.

În splina animalelor iradiate se constată o micşorare a proceselor de captare şi încorporare atît a S^{35} cît şi a Se^{75}, în organul întreg şi în proteinele splenice. În acelaşi interval de timp în rinichii animalelor iradiate cu 500 şi 800 r s-a evidenţiat creşterea includerii S^{35} şi Se^{75} atît în organul întreg, cît şi în proteinele acestuia. Doza de 200 r provoacă o scădere a captării şi încorporării acestor izotopi în organul studiat.

Se discută posibilitatea aplicării ipotezei de „eliberare a enzimelor" pentru explicarea modificărilor anabolice ale metioninei S^{35} şi selenometioninei Se^{75} ce au loc în organele studiate, în urma iradierii.

Cunoscînd faptul că metionina joacă un rol important în metabolismul intermediar şi că selenoanalogul ei prezintă un interes deosebit din punct de vedere biochimic, s-a considerat util un studiu comparativ al transformărilor acestor aminoacizi în boala actinică.

Rezultatele privind influenţa radiaţiilor ionizante asupra metioninei *in vivo* sînt contradictorii. Studiind pe animale încorporarea metioninei în proteinele diferitelor organe, în diverse perioade după iradiere, cu diferite doze de raze X, unii autori constată intensificarea proceselor de încorporare a metioninei în proteinele hepatice şi renale, dar încetinirea lor în proteinele splenice [1] — [4]. Alţi autori, dimpotrivă, constată o scădere a încorporării metioninei în toate aceste organe [5] — [10]. Se cunoaşte în altă ordine de idei, că administrarea metioninei reglementează sinteza acizilor nucleici în condiţii de iradiere [11]. Există presupuneri că sub influenţa radiaţiilor X *in vivo* are loc distrugerea metioninei [12]. În ceea ce priveşte selenometionina, este cunoscut faptul că în condiţii de iradiere *in vitro* ea are o acţiune protectoare mai mare decît metionina [13].

În lucrarea de faţă se raportează observaţiile asupra soartei anabolice a metioninei-S^{35} şi selenometioninei-Se^{75} în organele parenchimatice ale şobolanilor, după 24 ore de la iradierea cu raze X în doze de 200 r, 500 r, 800 r.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit şobolani albi, masculi, cu o greutate de 130 g, ţinuţi la o dietă standard. Metionina-S^{35} şi selenometionina-Se^{75} s-au administrat intraperitoneal, în doze de 0,5 mCi/g corp pentru metionina-S^{35} şi 1 mCi/g animal pentru selenometionina-Se^{75}.

Animalele au fost împărţite în patru loturi, cu 10—12 animale în fiecare lot, după cum urmează:

Lotul I. Animale martori, injectate cu metionina-S^{35} şi selenometionina-Se^{75}.

Lotul II. Animale injectate cu metionina-S^{35} şi selenometionina-Se^{75} şi iradiate cu o doză de raze X de 200 r, la 30 de minute după administrarea izotopilor.

Lotul III. Animale iradiate cu 500 r, tratate în prealabil în felul arătat la lotul II.

Lotul IV. Animale iradiate cu 800 r, tratate în prealabil în felul arătat la lotul II.

Iradierea s-a efectuat la aparatul Röntgentherapie Stabilvoli.

Doza de 200 r, 180 kV, 10 mA, d = 50 cm, f = 0,25 cm, Cu — 3′34″;
Doza de 500 r, 180 kV, 10 mA, d = 50 cm, f = 0,25 cm, Cu — 7′40″;
Doza de 800 r, 180 kV,10 mA, d = 50 cm, f = 0,25 cm, Cu — 12′16″.

După 24 ore de la iradiere animalele au fost sacrificate prin decapitare, preluîndu-se pentru studiu organele parenchimatoase (ficatul, splina, rinichii).

Pentru determinarea captării S^{35} în aceste organe, probele au fost omogenizate în NaOH 1 N, în tub închis, la 70°C, timp de 24 ore. Din acest omogenizat s-a aplicat pe ţintă o cantitate de 0,1 ml.

Determinarea încorporării S^{35} în proteinele hepatice, splenice şi renale s-a făcut după precipitarea proteinelor cu acetonă clorhidrică (HCl 1%), după care s-a folosit acelaşi procedeu ca la determinarea captării acestui izotop.

Pentru determinarea captării Se^{75} în organele studiate, radioactivitatea probelor de ţesut a fost determinată, fără nici o prelucrare prealabilă.

Studiul încorporării Se^{75} în proteinele acestor organe s-a efectuat tot după precipitarea proteinelor cu acetonă clorhidrică, după care radioactivitatea probelor a fost determinată direct.

Determinarea radiometrică a sulfului a fost efectuată cu numărătorul electronic IIC, 10 000 FLOX, cu contor Geiger-Müller VEB VAKUTRONIC VA-Z 310, cu fereastră terminală 2 mg/cm^2.

Măsurătorile radiometrice ale Se^{75} au fost efectuate cu numărătorul pe particule NUMEDIT 744, adaptat cu o sondă de scintilaţie cu turn NaS(Fe).

Activitatea determinată a fost exprimată în procente din activitatea totală şi raportată la organul întreg, uscat. La prelucrarea rezultatelor s-a folosit metoda curentă a biostatisticii.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conform rezultatelor noastre (figurile 1 şi 2), după 24 ore de la iradierea şobolanilor albi cu raze X în doze de 200 r, 500 r şi 800 r are

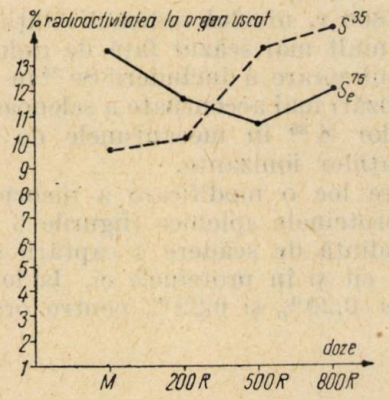


Fig. 1. — Captarea S^{35} şi Se^{75} în ficatul şobolanilor după 24 ore de la iradierea cu raze X.

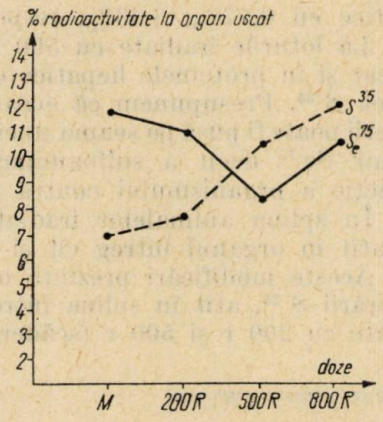


Fig. 2. — Încorporarea S^{35} şi Se^{75} în proteinele hepatice ale şobolanilor după 24 ore de la iradierea cu raze X.

loc o creştere cu 0,34%, 3,96%, respectiv 4,9% a captării S^{35} în ficatul animalelor iradiate. Paralel cu acesta s-a constatat şi o creştere cu 0,84%, 3,69%, respectiv 5,27% a încorporării S^{35} în proteinele organului respectiv, la toate loturile iradiate. Această creştere a încorporării S^{35} în proteinele ficatului, faţă de S^{35} captat în organul întreg, reprezintă 5,4% şi 5,5% pentru loturile iradiate cu dozele de 200 r şi 500 r, şi 11,3 % pentru lotul iradiat cu doza de 800 r. Kumta şi colab. [12], care au lucrat în condiţii asemănătoare cu ale noastre, dau rezultate care arată o scădere cu 25% faţă de martori a nivelului metioninei în ficatul şobolanilor albi, după 24 ore de la iradierea cu raze X, în doza de 600 r. Datele noastre nu confirmă acest lucru. Creşterea pronunţată a includerii metioninei-S^{35}, atît în ficatul întreg cît şi în proteinele hepatice, ne face să presupunem că iradierea şobolanilor albi cu raze X duce la intensificarea proceselor anabolice în ficat, în special a procesului de încorporare a metioninei în proteinele hepatice, efect care se intensifică paralel cu creşterea dozei.

Ţinînd cont de ipoteza lui Bacq şi Alexander referitoare la „eliberarea enzimelor" [14], considerăm că iradierea cu dozele de 200 ,500 şi 800 r duce la creşterea activităţii sistemelor enzimatice responsabile de încorporarea aminoacizilor sulfuraţi în proteinele hepatice, creştere care se accentuează paralel cu mărirea dozei.

Se cunosc fapte experimentale care confirmă că selenometionina se include în proteine în mod asemănător cu acela al analogului ei natural cu sulf [15] — [17]. Cercetările noastre anterioare au pus în evidenţă un nivel mai ridicat de încorporare a selenometioninei Se^{75} decît a metioninei S^{35} în organele parenchimatoase şi în proteinele lor, la şobolanii albi cărora li s-au administrat concomitent aceşti izotopi. În ceea ce priveşte încorporarea Se^{75} (figurile 1 şi 2) în ficatul şi în proteinele hepatice ale loturilor iradiate, rezultatele noastre nu au pus în evidenţă un paralelism cu procesele de încorporare a S^{35} în acest organ.

Iradierea animalelor duce la o scădere a captării şi încorporării Se^{75} în ficat cu 1,96 %, 2,88 & şi 1,49% faţă de martori, iar în proteinele hepatice cu 0,77%, 3,33%, respectiv 1,07%.

La loturile iradiate cu 500 r şi 800 r, nivelul radioactivităţii Se^{75} în ficat şi în proteinele hepatice este mult mai scăzut faţă de radioactivitatea S^{35}. Presupunem că această micşorare a încluderii Se^{75} în urma iradierii poate fi pusă pe seama unei utilizări mai accentuate a selenoaminoacizilor Se^{75} decît a sulfoaminoacizilor S^{35} în mecanismele de autoprotecţie a organismului contra radiaţiilor ionizante.

În splina animalelor iradiate are loc o modificare a încorporării S^{35} atît în organul întreg cît şi în proteinele splenice (figurile 3 şi 4).

Aceste modificări prezintă o tendinţă de scădere a captării şi încorporării S^{35}, atît în splina întreagă cît şi în proteinele ei, la loturile iradiate cu 200 r şi 500 r (scădere de 0,20% şi 0,22% pentru organul

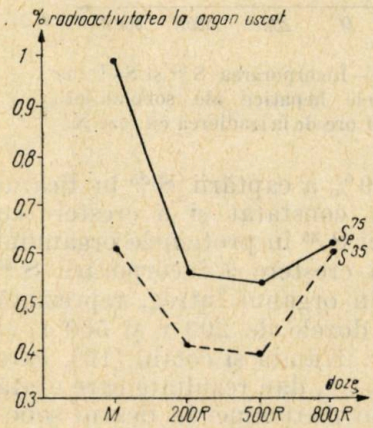


Fig. 3. — Captarea S^{35} şi Se^{75} în splina şobolanilor după 24 ore de la iradierea cu raze X.

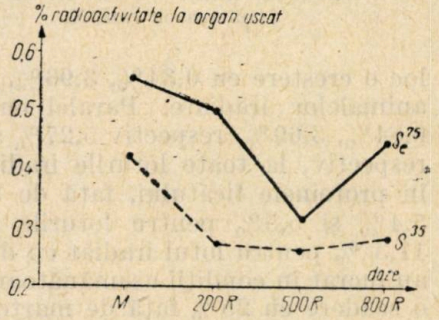


Fig. 4. — Încorporarea S^{35} şi Se^{75} în proteinele splenice ale şobolanilor după 24 ore de la iradierea cu raze X.

întreg, şi de 0,13% şi 0,14% pentru proteine). Deşi încorporarea S^{35} în splina animalelor iradiate cu 800 r este la nivelul valorii acelora din lotul martor (M — 0,61%; 800r—0,60%) totuşi încorporarea S^{35} în proteine este scăzută la acest lot şi nu se deosebeşte de valorile înregistrate la loturile iradiate cu 200 r şi 500 r (200 r — 0,28%; 500r—0,27%; 800 r—0,29%).

Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu datele autorilor [1] —[5], care semnalează o scădere a încorporării metioninei în proteinele splenice

ale animalelor iradiate. Această scădere ne arată că mecanismul încorporării metioninei S ^{35} în proteinele splenice nu rămîne intact la iradiere. Captarea Se ^{75} în splină şi încorporarea Se ^{75} în proteinele splenice prezintă un paralelism cu încluderea S ^{35}, în ambele cazuri constatîndu-se scăderea acestor procese (figurile 3 şi 4). Micşorarea încluderii S ^{35} şi Se ^{75} atît în organul întreg cît şi în proteinele splenice poate fi pusă pe seama blocării sistemelor enzimatice în urma iradierii.

În ceea ce priveşte rinichii, la animalele iradiate cu dozele de 500 r

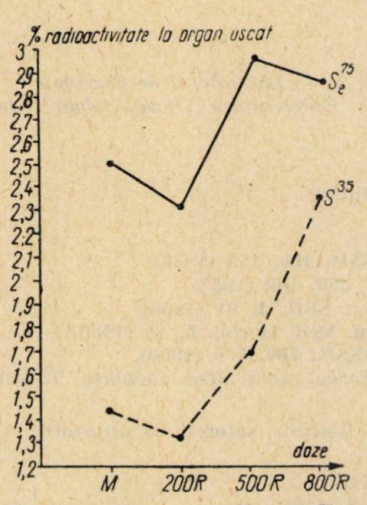


Fig. 5. — Captarea S ^{35} şi Se ^{75} în rinichii şobolanilor după 24 ore de la iradierea cu raze X.

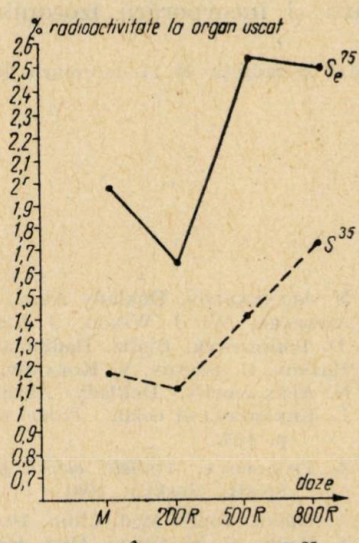


Fig. 6. — Încorporarea S ^{35} şi Se ^{75} în proteinele renale ale şobolanilor după 24 ore de la iradierea cu raze X.

şi 800 r s-a pus în evidenţă o creştere a încluderii S ^{35} şi Se ^{75} în organul întreg şi în proteinele renale, faţă de martori (figurile 5 şi 6). Scăderea nesemnificativă a încluderii S ^{35} şi Se ^{75} în rinichi şi în proteinele renale la lotul iradiat cu 200 r îşi găseşte greu explicaţia, dacă ţinem cont de creşterile înregistrate la celelalte loturi.

Ţinînd cont de scăderea eliminării radioactivităţii globale de S ^{35} şi Se ^{75} în urma iradierii (date nepublicate), putem presupune că creşterea încluderii acestor izotopi în rinichi nu poate fi pusă pe seama activităţii excretoare a acestui organ. Probabil, ca şi în cazul ficatului, creşterea încluderii S ^{35} şi Se ^{75} în rinichi şi în proteinele renale poate fi pusă pe seama activităţii sistemelor enzimatice în urma iradierii, ceea ce pe baza ipotezei de „eliberare a enzimelor" este foarte posibil.

CONCLUZII

Studiul comparativ al captării şi încorporării metioninei S ^{35} şi selenometioninei-Se ^{75} în ficat, splină, rinichi şi în proteinele acestor organe la şobolani albi, iradiaţi cu raze X arată că :

1. După 24 ore de la iradiere are loc creşterea captării şi încorporării S ^{35} în ficat şi în proteinele hepatice, iar în cazul Se ^{75} o scădere a acestor procese.

2. În acelaşi interval de timp, în splina animalelor iradiate s-a pus în evidenţă o micşorare a proceselor de captare şi încorporare atît a S ^{35} cît şi a Se ^{75}, în organele întregi şi în proteinele lor.

3. Iradierile cu 500 şi 800 r induc creşterea încluderii S ^{35} şi Se ^{75} în rinichi şi proteinele acestora, pe cînd doza de 200 r duce la scăderea captării şi încorporării izotopilor utilizaţi.

Prezentat la redacţie la 17 decembrie 1969

Laboratorul de biochimie
Universitatea „Babeş-Bolyai" Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. S N. Alexandrov, Doklady Akad. Nauk SSSR, **106**, 153 (1956).
2. J. Awapara, W. J. Wingo, J. Biol. Chem., **203**, 189 (1953).
3. M. D. Podiljshak, Biofiz. Radiobiol. AN Ukr. SSR, **1**, 91 (1966).
4. A. Rainov, B. Ivanov, V. Kolanov, Eksperim. Med. Morfol, **5**, 13 (1966).
5. S. N. Alexandrov, Doklady Akad. Nauk SSSR, **106**, 596 (1956).
6. R. L. Chkareuli et colab., *Trudy pervoi Zakavkaz. konf. Med. Radiolog* Tbilisi, 1956, p. 104.
7. T. A. Teodorova, *Azotistii obmen pri lucevoi bolezni*, Autoref. de disertaţie, A. M. N. SSSR, Moskva, 1961.
8. V. A. Revis, Voprs. Med. Chim, **10**, 513 (1964).
9. V. A. Revis, N. V. Totov, Med. Radiol., **9**, 54 (1964).
10. J. Neuwirt, Z. Pokorny, J. Borova, Strahlentherapie, **120**, 308 (1963).
11. M. K. Nerurkar, A. J. Baxi, N. S. Randive, M. V. Narurkar, M. B. Sahasrbudhe, Nature, **180**, 193 (1957).
12. U. S. Kumta, S. U. Gurnani, M. B. Sahasrabudhe, Current, Sci., 11, **362** (1955).
13. F. Shimaru, A. J. Tappel, Radiation. Res., **23**, 210 (1964).
14. H. K. Awwad, E. J. Potchen, S. I. Adelstein, J. B. Jr. Dealy, Metabol. Clin. Exptl, **15**, 370 (1966).
15. H. K. Awwad, E. J. Potchen, S. I. Adelstein, J. B. Jr. Dealy, Metabol. Clin. Exptl, **15**, 626 (1966).
16. H. K. Awwad et colab., J. Biol. Chem, **242**, 492 (1967).
17. Z. M. Bacq, A. Herve, Bull. Acad. Med. Belg., **18**, 13 (1952).
18. V. Kovács, *Unele aspecte ale metabolismului metioninei sub influenţa razelor X*, Teză de disertaţie Bucureşti, 1968.

SOME ASPECTS OF THE METABOLISM OF ^{35}S-METHIONINE AND, ^{75}SE-SELENOMETHIONINE IN WHITE RATS

SUMMARY

The uptake and incorporation of ^{35}S-methionine and ^{75}Se-selenomethionine into liver, spleen, kidney and proteins of these organs was investigated in X-ray irradiated (200, 500 and 800 r) white rats.

It was established that 24 hours after irradiation an increase of ^{35}S uptake and incorporation takes place both in the whole liver and in its proteins. Under the same conditions a decrease of these processes occurs in the case of ^{75}Se.

In the spleen of irradiated animals a decrease in ^{35}S and ^{75}Se uptake and incorporation was observed, both in the whole organ and in its proteins. As far as the kidneys are concerned, the effect of the irradiation is dose dependent.

The hypothesis of "enzyme liberation" is discussed in view of an explanation of the observed anabolic modifications.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 389 – 398 (1970)

EFECTUL INHIBITOR AL UROCROMULUI ŞI EXTRACTULUI APOS DE FICAT ASUPRA IODURĂRII ENZIMATICE A TIROZINEI-^{14}C ŞI A TIROGLOBULINEI CU PEROXIDAZĂ TIROIDIANĂ ŞI H_2O_2 *IN VITRO* [1]

TR. C. LAZĂR

Rezumat. — S-a studiat iodurarea tirozinei-^{14}C şi a tiroglobulinei, precum şi cuplarea oxidativă a iodotirozinelor cu formare de iodotironine, în prezenţa peroxidazei tiroidiene şi a H_2O_2 *in vitro*.

Rezultatele obţinute demonstrează că peroxidaza tiroidiană, solubilizată şi parţial purificată, este foarte activă în catalizarea reacţiei de iodurare a tirozinei-^{14}C şi tiroglobulinei, în acelaşi timp ea fiind eficientă şi în cuplarea oxidativă a iodotirozinelor, cu formare de iodotironine.

Prezenţa urocromului sau a extractului apos de ficat în mediul de reacţie, a produs o inhibare a iodurării tirozinei-^{14}C şi tiroglobulinei, dar a influenţat neînsemnat formarea iodotironinelor.

Cercetările epidemiologice şi experimentale au arătat că urocromul, existent în urină şi în apa poluată cu produse de excreţie animală, manifestă un efect guşogen apreciabil [9] — [12], [23], [24]. Pe de altă parte, se ştie de multă vreme că ingestia de ficat are un efect guşogen [3], [17] — [20], [32], [34]. Existenţa unui factor antitiroidian în ficat a fost susţinută şi în cercetările recente, care au indicat că principiul activ are o natură organică, fiind, probabil, o polipeptidă [33] şi este extractibil cu apa [25], [26].

Ţinînd seama de datele experimentale care tind să arate că ficatul reprezintă locul de formare a urocromului [7], [37], [41], ca şi de faptul că mecanismul de acţiune guşogenă a urocromului şi a factorului antitiroidian din ficat nu a fost încă lămurit, am cercetat efectul urocromului şi al extractului apos de ficat asupra iodurării tirozinei-^{14}C şi tiroglobulinei, precum şi asupra cuplării oxidative a iodotirozinelor, cu formare de iodotironine, în prezenţa peroxidazei tiroidiene şi a H_2O_2 *in vitro*.

---

[1] Lucrarea a fost efectuată în cadrul Departamentului de biochimie al Institutului Nobel din Stockholm, sub îndrumarea profesorului Hugo Theorell şi a docentului L. G. Ljunggren, pentru care le exprim şi pe această cale întreaga mea recunoştinţă.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea peroxidazei tiroidiene s-a făcut printr-o tehnică inspirată din metodele utilizate de Mahoney [29], Hosoya [16] şi Ljunggren [28 a], la care s-au adus unele modificări. Izolarea şi purificarea enzimei, comportă trei faze : 1) obţinerea omogenatului tiroidian, 2) izolarea particulelor bogate în peroxidază (fracţiunea ribozomială), 3) solubilizarea, purificarea şi concentrarea enzimei.

1) *Obţinerea omogenatului tiroidian* : 5 kg tiroide de viţel proaspete, îngheţate, au fost debarasate de ţesuturile aderente, obţinîndu-se cca 2 kg ţesut tiroidian. Acesta a fost tăiat în bucăţi mici şi spălat cu un volum dublu de ser fiziologic, la 0°C, apoi s-a omogenizat fin cu ajutorul unui omogenizator ultra Turack, în 2 litri tampon fosfat 0,05 M (pH 7,4) care conţinea zaharoză (0,25 M) şi KI (10^{-5}M). După o şedere de 2 ore la +4°C, omogenatul s-a centrifugat 10 minute cu 3000 r.p.m., iar supernatantul s-a trecut printr-un tifon întins peste un filtru poros. Sedimentul rezultat s-a omogenizat din nou, timp de 5 minute, cu un litru tampon fosfat-zaharoză-KI, şi s-a centrifugat ca mai sus, iar supernatantul rezultat s-a adăugat la cel iniţial.

2) *Izolarea particulelor subcelulare (ribozomilor) bogate în peroxidază.* Supernatantele reunite s-au centrifugat 30 minute cu 10 000 r.p.m, pentru îndepărtarea mitocondriilor. Sedimentul mitocondrial, care conţinea şi polizomii grei, s-a omogenizat cu 500 ml tampon fosfat-zaharoză-KI, în omogenizator Potter, şi s-a centrifugat ca mai sus, iar supernatantul s-a adăugat la cel iniţial. Supernatantul mitocondrial reunit s-a centrifugat apoi la rece, cu 30 000 r.p.m., timp de 120 minute, în vederea colectării fracţiunii microzomiale bogate în peroxidază.

Sedimentul microzomial s-a omogenizat cu 500 ml tampon fosfat zaharoză-KI şi s-a centrifugat ca mai sus. Final, sedimentul microzomial din fiecare tub de centrifugă s-a omogenizat cu 50 ml acetonă care conţinea KI (10^{-5}M), timp de 10 minute, în omogenizatorul Potter, la —6°C. Întregul sediment microzomial s-a omogenizat cu 500 ml acetonă-KI. Suspensia acetonică s-a centrifugat 15 minute cu 3000 r.p.m., iar sedimentul obţinut s-a uscat în exsicator, peste acid sulfuric, în vid, la —20°C, obţinîndu-se astfel pulberea acetonică de ribozomi tiroidieni bogaţi în peroxidază (forma de păstrare a enzimei).

3) *Solubilizarea şi purificarea peroxidazei tiroidiene.* Pulberea acetonică de microzomi tiroidieni s-a omogenizat cu 180 ml tampon tris — HCl 0,05 M (pH 8,5) care conţinea KI 10^{-5}M şi s-a amestecat cu supernatantul obţinut din 100 mg venin de şarpe suspendat în 20 ml tampon tris HCl, 0,05 M (pH 8,5), care conţinea KI 10^{-5}M şi care s-a păstrat în baia de apă la fierbere timp de 10 minute, după care s-a centrifugat 3 minute cu 5000 r.p.m. [30]. Preparatul enzimatic, împreună cu supernatantul obţinut din veninul de şarpe, s-au introdus într-un cilindru prevăzut cu un dop prin care trecea un tub de sticlă de la nu rezervor de azot şi s-a păstrat, sub agitarea magnetică, 20 ore, la +4°C, în atmosferă de azot. După aceasta, suspensia s-a centrifugat 60 minute cu 40 000 r.p.m., iar sedimentul obţinut s-a omogenizat în 100 ml tam-

pon tris-HCL 0,05 (pH 8,5) care conținea KI 10^{-5}M și a fost supus digestiei cu tripsină și dezoxicolat [13, 14, 28 a, 29]:

a) 40 mg tripsină s-au dizolvat în 40 ml HCl 10^{-3}M și s-a diluat la 50 ml cu tampon tris-HCl (pH 8,5) care conținea KI 10^{-5}M;

b) 400 mg Na-dezoxicolat s-au dizolvat în 20 ml H_2O + 30 ml tampon tris-HCl, pH 8,5, care conținea KI 10^{-5}M.

Preparatul enzimatic s-a introdus într-un pahar, apoi s-au adăugat 30 ml din soluția de tripsină și 30 ml soluție dezoxicolat de sodiu. După o agitare magnetică de 3 ore, s-au adăugat 3 ml soluție de inhibitor tripsinic (40 mg inhibitor tripsinic s-au suspendat în 40 ml tampon tris-HCl, pH 8,5, care conținea KI 10^{-5}M) și s-a continuat agitarea încă 5 min. Apoi preparatul enzimatic s-a centrifugat 90 min. cu 40 000 r.p.m. Activitatea peroxidazică a trecut cantitativ în supernatant. La supernatant s-au adăugat apoi 1,5 volume soluție saturată de sulfat de amoniu, obținîndu-se în final o soluție saturată 60%, care a fost lăsată peste noapte la + 4°C, iar precipitatul rezultat s-a separat prin centrifugare timp de 30 min. cu 25 000 r.p.m. Precipitatul a fost suspendat într-un volum minim de tampon fosfat 0,1 M pH 6,5 și dializat, sub agitare magnetică, cîteva ore, contra aceluiași tampon, care a fost schimbat de trei ori. La sfîrșit dializatul a fost centrifugat, iar soluția clară, de culoare brună, a fost trecută peste o coloană de Sephadex G-200 (3×80), în prealabil echilibrată cu același tampon. După ce întregul preparat enzimatic a fost absorbit de coloană, aceasta a fost spălată cu 250 ml tampon fosfat 0,1 M (pH 6,5). Enzima reținută pe coloană a fost eluată cu tampon fosfat 0,05 M (pH 6,5). Viteza de curgere a fost de 10 ml/oră, iar fracțiunile colectate au fost de 3 ml. În fiecare fracțiune s-a măsurat absorbția proteinelor la 280 mμ și s-a determinat activitatea peroxidazică.

Conținutul tuburilor care prezentau activitate peroxidazică a fost reunit și s-a introdus în saci de dializă, care au fost suspendați 5 ore în etilenglicol 25%, sub agitare magnetică, la + 4°C.

Concentrația proteinelor în diferitele faze de preparare a enzimei s-a determinat după metoda Gornall [8].

Măsurarea activității peroxidazice s-a făcut spectrofotometric, utilizînd ca substrate guaiacolul și iodura [14], [15]. Cantitatea de enzimă care a produs o creștere a densității optice (absorbției) la 470 mμ în cazul guaiacolului și respectiv la 350 mμ în cazul utilizării iodurii, egală cu 0,001 unități pe sec. a fost definită ca o miliunitate și a fost considerată ca unitate guaiacol, respectiv iodură [16]. Produsul final a prezentat o activitate specifică (număr de unități/mg proteină) egală cu 1,040, față de 0,002 cît avea omogenatul inițial, ceea ce înseamnă că s-a realizat o purificare a enzimei de cca 500 de ori.

Iodurarea tirozinei-^{14}C. L-tirozină-^{14}C (uniform marcată), aflată în soluție de HCl N, a fost adusă la pH 7,4 cu NaOH 2N (1 ml soluție tirozină-^{14}C, 0,6 ml NaOH 2N, 0,5 ml tampon fosfat 0,5 M, pH 7,4 și 1 ml H_2O = soluție stoc).

Amestecul de reacție conținea: 0,07 soluție stoc de tirozină-^{14}C, 0,20 ml soluție KI 0,1 mM, 0,1 ml soluție tampon fosfat 0,5 M, pH 7,4, 100 unități peroxidază tiroidiană, 0,43 ml H_2O. Volum final 1 ml.

În probele în care s-a cercetat efectul urocromului, izolat din urină după metoda Hettche [9], modificată [3a], sau al extractului de ficat, obținut după Levey [25], mediul de reacție mai conținea : 0,3 — 3 mg urocrom, respectiv 0,5 — 5 mg reziduu de extract apos de ficat.

Reacția s-a condus 60 min la 24°C, sub agitare magnetică și cu adăugare continuă de H_2O_2, cu un volum constant de 0,05 ml/oră, dintr-o seringă Agla, cu ajutorul unui micrometru acționat de un motor. Cantitatea totală de apă oxigenată adăugată a fost de cca 500 mμ moli. De fiecare dată soluția de apă oxigenată utilizată s-a preparat proaspăt. În tot timpul reacției soluția a fost agitată cu un agitator magnetic.

Analiza produșilor formați s-a făcut radio-cromatografic. În acest scop, la începutul și sfîrșitul experiențelor s-au aplicat pe o hîrtie Whatman 1, lată de 3,5 cm, cîte 20 μl din amestecul de reacție și, după o prealabilă echilibrare de 1—2 ore, s-a cromatografiat cu sistemul butanol-acid acetic-apă (4 : 1 :1). Identificarea spoturilor radioactive s-a făcut cu ajutorul substanțelor standard [2].

Înregistrarea radioactivității cromatogramelor s-a făcut cu un dispozitiv automat, iar calcularea procentuală a radioactivității diferitelor spoturi s-a făcut prin planimetrarea grafică a diferitelor piscuri de pe radiocromatogramă și s-a exprimat în procente din radioactivitatea totală a cromatogramei.

Iodurarea tiroglobulinei. Tehnica și condițiile de lucru au fost aceleași ca în cazul iodurării tirozinei-^{14}C. Amestecul de reacție conținea : 3 mg tiroglobulină bovină, 0,50 μ moli KI, 25 μC Na ^{131}I, 100 unități de peroxidază tiroidiană, tampon fosfat 0,5M, pH 7,4. Volum final 1 ml.

În probele în care s-a urmărit efectul urocromului sau al extractului apos de ficat asupra iodurării tiroglobulinei, mediul de reacție mai conținea 3 mg urocrom, respectiv 5 mg reziduu apos de extract de ficat. Incubarea s-a făcut 60 min la 24°C, sub agitare magnetică și cu adăugare continuă de H_2O_2, în condițiile descrise la iodurarea tirozinei.

După incubare, mediul de reacție a fost analizat cromatografic, în condițiile descrise anterior, iar restul amestecului de reacție a fost supus digestiei cu pronază [39] : 0,5 ml din mediul de reacție s-au introdus într-o eprubetă care conținea 0,2 ml tampon Tris-NaCl, pH 8,5 (0,24M Tris-0,66 M NaCl), 40 μl NaOH N, 20 μl 0,75% 1-metil-2 mercaptoimidazol, 0,2 ml soluție de pronază (35 mg/ml) și s-a păstrat 16 ore la 37°C, iar hidrolizatul obținut a fost analizat radiocromatografic, după tehnica descrisă anterior.

Produșii de reacție identificați în hidrolizat au fost monoiodotirozina (MIT), diiodotirozina (DIT) și urme de tiroxină (T_4). Rezultatele au fost calculate și exprimate în același mod ca și în cazul iodurării enzimatice a tirozinei-^{14}C.

Formarea iodotironinelor. Tehnica și condițiile de experimentare au fost similare cu cele folosite de Fischer și colab. [6], cu deosebirea că în locul fracțiunii mitocondro-microzomiale întrebuințate de acești autori, în cercetările noastre s-a folosit un preparat de peroxidază tiroidiană parțial purificată.

Mediul de reacție conținea : 10 mM monoiodotirozină sau diiodotirozină, 10 μC ^{131} I-monoiodotirozină (respectiv 10 μC ^{131} I-diiodotiro-

zină), 3,33 mM $MnCl_2$, 1,67 μM piridoxal, 16,7 mM Tris, pH 7,4. Volum final 3 ml.

În probele în care s-a urmărit efectul urocromului sau al extractului de ficat asupra formării iodotironinelor, mediul de incubare conținea în plus 3 mg urocrom, respectiv 5 ml reziduu de extract apos de ficat. Reacția a durat 16 ore la 30°C, sub agitare magnetică și la întuneric, cu adăugare continuă de peroxidază tiroidiană și apă oxigenată, din 2 seringi acționate fiecare de un micrometru pus în mișcare de un motor, cu un volum constant de 0,05 ml/oră.

După terminarea reacției, conținutul vasului a fost analizat radiocromatografic, în condițiile descrise anterior. Identificarea spoturilor, măsurarea radioactivității cromotogramelor și calcularea rezultatelor s-au făcut în modul arătat anterior.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Iodurarea enzimatică a tirozinei libere a fost investigată de numeroși autori, care au utilizat în acest scop preparate purificate de mieloperoxidază (peroxidază leucocitară), lactoperoxidază, chloroperoxidază, peroxidază din hrean, sau preparate parțial purificate de peroxidază tiroidiană, în prezența peroxidului de hidrogen sau a unui sistem generator de H_2O_2 [1], [4], [22], [28], [31], [39], [42]. Pe baza acestor cercetări s-a admis, în general, implicarea peroxidazei tiroidiene și a H_2O_2 în reacțiile de iodurare biologică din glanda tiroidă.

Rezultatele cercetărilor noastre care fac obiectul prezentei lucrări dovedesc că peroxidaza tiroidiană, solubilizată și parțial purificată, este eficientă atît în oxidarea iodurii, pe seama peroxidului de hidrogen, cît și în catalizarea reacției de iodurare a tirozinei-^{14}C (tabela 1).

Tabela 1

Efectul inhibitor al urocromului și al extractului de ficat asupra formării iodotirozinelor *in vitro* (condițiile de reacție sînt descrise în text)

Inhibitor adăugat în mediu (mg)	Cantitatea de peroxidază tiroidiană din mediu (unit. convenționale)	Cantitatea de H_2O_2 adăugată în 60 min. (mμ moli)	Procentul de ^{14}C regăsit în:				
			Tirozină	MIT*	DIT**	origine+ RF 0,05–0,01	Front
—	100	500	41	33	19	6	0
Urocrom							
0,3	100	500	72	21	3	4	0
3,0	—	500	86	12	—	2	0
Extract hepatic							
0,5	100	500	60	24	11	4	1
5,0	100	500	69	17	6	5	3

* MIT = 3 monoiodotirozină; ** DIT = 3,5 diiodotirozină

Adăugarea urocromului sau a extractului de ficat în mediul de reacţie, în diferite concentraţii, a avut un efect inhibitor asupra activităţii enzimatice (figura 1 şi tabela 1). Astfel, în timp ce în cazul probelor de control (efectuate în absenţa urocromului şi a extractului de ficat în mediul de reacţie) peroxidaza tiroidiană a catalizat în 60 min iodurarea a peste 50% din tirozina-^{14}C, cu formare de 3-monoiodotirozină (33%) şi 3,5-diiodotirozină (19%), prezenţa urocromului sau a

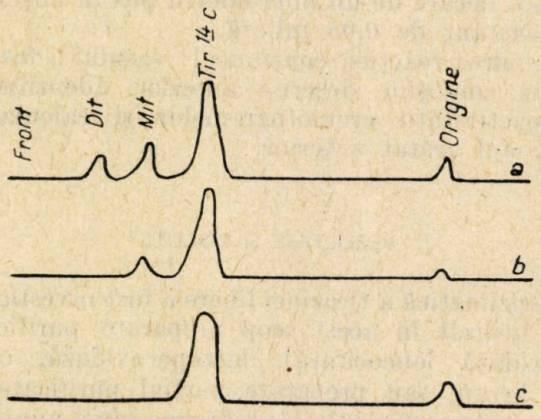


Fig. 1 — Efectul inhibitor al urocromului asupra iodurării tirozinei-^{14}C catalizată de peroxidaza tiroidiană, în prezenţa H_2O_2.

a — radiocromatograma iodurării tirozinei — ^{14}C în absenţa urocromului în mediul de reacţie; *b* — radiocromatograma iodurării tirozinei-^{14}C în prezenţa a 2,5 mg urocrom/ml de reacţie; c — radiocromatograma iodurării tirozinei-^{14}C în prezenţa a 5 mg urocrom/ml mediu de reacţie. Se observă că inhibarea iodurării tirozinei-^{14}C, catalizată de peroxidaza tiroidiană, este proporţională cu cantitatea de urocrom adăugată în mediul de reacţie.

extractului de ficat în mediul de reacţie a micşorat randamentul de formare a iodotirozinelor (tabela 1); efectul inhibitor cel mai exprimat s-a manifestat asupra formării diiodotirozinei (figura 1). În concentraţiile utilizate, extractul de ficat a manifestat un efect inhibitor mai redus asupra iodurării enzimatice a tirozinei-^{14}C decît urocromul (tabela 1). O interpretare cantitativă corectă a acestor date este însă îngreunată de necunoaşterea concentraţiilor molare ale principiilor active (peroxidaza, urocromul şi factorul antitiroidian din extractul de ficat). Cu toate acestea, precizarea experimentală că prezenţa urocromului sau a extractului apos de ficat inhibă formarea iodotirozinelor (tabela 1 şi figura 1) ni se pare importantă pentru demonstrarea şi explicarea acţiunii antitiroidiene a acestor factori.

Acţiunea inhibitoare a urocromului şi a extractului apos de ficat asupra activităţii peroxidazei tiroidiene s-a observat şi în cazul utilizării guaiacolului ca substrat, ceea ce pare să excludă posibilitatea ca reducerea iodurării tirozinei, constatată în prezenţa acestor factori, să fie rezultatul inhibării unei eventuale „iodaze" care ar putea însoţi peroxidaza tiroidiană, parţial purificată. Datele noastre sînt compatibile cu ideea că însăşi peroxidaza tiroidiană manifestă o activitate iodantă, care este sensibilă la acţiunea agenţilor antitiroidieni testaţi.

Ţinînd seama că una din particularităţile esenţiale ale biosintezei hormonilor tiroidieni este aceea că ei se formează în interiorul tiroglobulinei, ne-am pus problema în ce măsură peroxidoza tiroidiană este eficientă în iodrarea tiroglobulinei, în prezenţa H_2O_2, şi care este efectul adăugării urocromului sau a extractului de ficat în mediul de reacţie, asupra încorporării $^{131}I^-$ în resturile tirozil din interiorul tiroglobulinei. Rezultatele experimentale obţinute (tabela 2) arată că peroxidaza tiroidiană este foarte activă în iodurarea tiroglobulinei, ceea ce nu este surprinzător, ţinînd seama că aceasta reprezintă însuşi substratul fiziologic al reacţiilor de iodurare din glanda tiroidă [15], [27], [38], [40]. Pentru concentraţii de I^- şi tiroglobulină care pot fi considerate fiziologice, iodurarea enzimatică a tiroglobulinei s-a produs cu un randament mai mare decît iodurarea tirozinei libere (tabelele 1 şi 2).

Tabela 2

Efectul urocromului şi al extractului de ficat asupra iodurării enzimatice a tiroglobulinei cu ajutorul peroxidazei tiroidiene în prezenţa H_2O_2

Natura şi concentr. substanţ. adăug. în mediul de reacţie (mg)	% ^{131}I existent în									
	Mediul de incubare							Hidrolizatul mediului de incubare		
	Fracţ. nedializab.	Fracţ. dializ. (calc. prin dif.)	Origine cromatograf.	$^{131}I^-$	Origine	MIT	DIT	Iodotironine	I^-	Front
—	66,9	33,1	73,2	26,4	4,2	39,6	20,3	1,1	31,7	3,0
—										
Urocrom (3 mg)	46,7	53,3	51,5	49,1	4,8	24,4	11,7	—	54,6	3,3
Extract hepatic (5 mg)	49,1	50,9	50,9	48,7	5,1	27,9	14,2	—	49,9	2,5

Atît urocromul cît şi extractul apos de ficat adăugate în mediul de reacţie s-au dovedit a avea un efect inhibitor şi asupra iodurării enzimatice a tiroglobulinei, dar acesta a fost mai redus decît în cazul iodurării tirozinei libere (tabela 2). Este probabil că atît urocromul cît şi factorul antitiroidian din extractul apos de ficat reprezintă inhibitori ai peroxidazei tiroidiene, ceea ce ar putea explica acţiunea lor guşogenă.

Una din etapele cele mai controversate ale biosintezei hormonilor tiroidieni o reprezintă reacţia de cuplare oxidativă a iodotirozinelor, cu formare de iodotironine. Este surprinzător că deşi s-au consacrat numeroase studii elucidării mecanismului de hormonogeneză tiroidiană, pînă în prezent există numai puţine cercetări prin care să se fi urmărit formarea iodotironinelor in vitro, în prezenţa unor fracţiuni subcelulare [5], [6], [21], [36] sau a unor preparate enzimatice tiroidiene, parţial purificate [43]. Aceasta ne-a determinat să investigăm rolul pe care peroxidaza tiroidiană îl are în cuplarea oxidativă a iodotirozinelor, cu formare de iodotironine, ca şi influenţa urocromului şi a extractului apos de ficat asupra acestui proces.

Rezultatele obținute (tabela 3) invederează rolul catalitic al peroxidazei tiroidiene în formarea 3,3'-diiodotironinei (T_2') și a tiroxinei (T_4), pe seama 3-monoiodotirozinei și, respectiv, 3,5-diiodotirozinei. Deși, în condițiile noastre experimentale, conversiunea iodotirozinelor

Tabela 3

Efectul urocromului și al extractului de ficat asupra formării iodotironinelor din iodotirozine în prezența peroxidazei tiroidiene și H_2O_2 *in vitro*

Adausul suplimentar în mediul de incubare	Cantit. de peroxidază adăugată (unități convenț.)	Cantitate H_2O_2 adăugată (mμ moli)	% ^{131}I total de pe cromatogramă regăsit în	
			(^{131}I)—3,5-diiodotironină (T_2') formată prin incubarea (^{131}I) monoiodotirozinei.	(^{131}I)-tiroxină (T_4) formată prin incubarea (^{131}I) diiodotironinei
—	200	8000	11,6±2,5	8,8±1,7
Urocrom (3 mg)	200	8000	9,9±1,8	7,7±1,3
Extract hepatic (5 mg)	200	8000	8,7±1,3	6,9±1,1

în iodotironinele corespunzătoare a avut loc cu un randament mai mic decît cel observat de alți autori, care au utilizat fracțiunea microzomială [6], cercetările noastre demonstrează clar rolul catalitic al peroxidazei tiroidiene în formarea iodotironinelor pe seama iodotirozinelor libere, ceea ce reprezintă prima dovadă directă adusă în acest sens și ridică problema posibilității de sinteză a hormonilor tiroidieni liberi în însăși glanda tiroidă.

Adăugarea urocromului și, respectiv, a extractului apos de ficat în mediul de incubare a manifestat un efect inhibitor mai redus asupra formării iodotironinelor (tabela 3) decît cel evidențiat în cazul iodurării tirozinei-^{14}C (tabela 1) sau al tiroglobulinei (tabela 2). Aceasta s-ar putea explica prin faptul că în experiențele de formare a iodotironinelor, pe seama iodotirozinelor corespunzătoare, adăugarea peroxidazei tiroidiene s-a făcut în mod continuu, în tot timpul reacției, ceea ce nu a fost cazul în cursul experiențelor de iodurare a tirozinei ^{14}C și a tiroglobulinei.

CONCLUZII

1) Peroxidaza tiroidiană, solubilizată și parțial purificată catalizează deopotrivă oxidarea iodurii și iodurarea tirozinei libere sau incluse în tiroglobulină.

2) Pentru concentrații de I^- și tiroglobulină care pot fi considerate în limite fiziologice, iodurarea tiroglobulinei cu peroxidază tiroidiană are loc cu un randament mai mare decît iodurarea tirozinei libere.

3) Peroxidaza tiroidiană este efectivă în catalizarea formării, 3,3'-diiodotironinei și a tiroxinei pe seama 3-monoiodotirozinei și, respectiv, 3,5-diiodotirozinei.

4) Urocromul şi factorul antitiroidian din ficat exercită un efect inhibitor asupra iodurării tirozinei libere sau incluse în tiroglobulină, ceea ce sugerează caracterul lor de inhibitori ai peroxidazei tiroidiene şi explică acţiunea lor guşogenă.

Prezentat la redacţie la 29 septembrie 1969

Catedra de biochimie I.M.F. Cluj,
str. Pasteur nr. 6

BIBLIOGRAFIE

1. Alexander N. M., J. Biol. Chem., **234**, 1530 (1959).
2. Bowden C. H., Mc Lagan F. N. Wilkinson H. J., Biochem. J., **59**, 93, (1955).
3. Burget G. E., Am. J. Physiol., **44**, 492, (1917).
3a. Chalupa J. şi Kacovska I., *Sbornik Vysoké skoly chemickotechnologické v Praze. Oddil technologie vody* 5/1, 61. 1961.
4. De Groot L. J., New Engl. J. Med., **272**, 243 (1965); **297**, 355 (1965).
5. Fischer A. G., Schulz A. R. şi Oliner L., Biochem. Biophys. Res. Commun., **14**, 39 (1963).
6. Fischer A. G., Schulz A. R. şi Oliner L., J. Biol. Chem., **240**, 4338 (1965).
7. Fujino T. Yasuji O., Kekkaku, **17**, 2, (1939).
8. Gornall A. G., Bardawill C. J. şi David M. M., J. Biol. Chem., **177**, 751 (1949).
9. Hettche H. O., *Ätiologie, Pathogenese u. Prophylaxe der Struma. Monographie*, Verl. Lehman, München, 1954.
10. Hettche H. O., Ges. u. Wasserf., **96**, *20*, 660 (1955).
11. Hettche H. O., Gesd. Ing., **76**, *19/20*, 309 (1955).
12. Hettche H. O., Materia Medica Nordmark, **9**, 43 (1957).
13. Horie S. şi Morrison M., J. Biol. Chem, **238**, 1855, (1963).
14. Hosoya T., J. Biochem. (Jap.) **53**, 86 (1963).
15. Hosoya T., Bondo Y. şi UI N., J. Biochem. (Jap.), **52**, 180 (1962).
16. Hosoya T. şi Morrison M., J. Biol. Chem., **242**, 2828 (1967).
17. Hou H. C., Chinese J. Physiol., **10**, 659 (1936).
18. Hou H. C., Chinese J. Physiol., **12**, 488 (1937).
19. Hou H. C., Procceding Soc. Exp. Biol. Med., **43**, 753 (1940).
20. Hunt R., Am. med. Ass., **57**, 1032 (1911).
21. Igo R. P. şi Mackler B., Arch. Biochem. Biophys., **95**, 12 (1961).
22. Klebanoff S. J., YIP C. şi Kessler D., Biochim. Biophys. Acta, **58**, 563 (1962).
23. Lazar Tr. Catana R., Gorun V., *A II-a Conf. Republ. de Chimie*, Iaşi, mai 1964, vol. rez. p. 132.
24. Lazar Tr. şi Uray Z., *Conf. Nat. de Fiziol.*, Bucureşti 1964, vol. rez. p. 58.
25. Levey H. A., Endocrinology, **78**, 633 (1966)
26. Levey H. A., Endocrinology, **80**, 417 (1967).
27. Lissitzky S. şi Denabdeljlil Cl., Bull. Soc., Chim, Biol., **47**, 655 (1965).
28. Ljunggren J. G., Biochim. Biophys. Acta, **113**, 71 (1966).
28. a. Ljunggren J. G., Comunicare personală.
29. Mahoney C.P. şi Igo R. P., Biochim. Biophys Acta, **113**, 507 (1966).
30. Mai Y şi Sato R., Biochim., Biophys., Acta, **42**, 164 (1960).
31. Maloof F. şi Soodak M., Pharmacol. Rev., **15**, 43 (1963).
32. Marine D. J., Exp. Med., **19**, 70 (1914).
33. O'Dell B. L., Stolzenberg S. J., Brummer J. H. şi Hocan A. G., Arch. Biochem. Biophys., **54**, 232 (1955).
34. Remington R. E., J. Nutrition, **13**, 223 (1937).
35. Richards J. B. şi Ingbar S. H., Endocrinology, **65**, 198 (1959).
36. Schulz A. R., Fischer A. G. şi Oliner L., Fed. Proc., **23**, 433 (1964).
37. Shibata Y., Kuroda Y. şi Tabata E., Seikagaku, **30**, 725 (1958).
38. Taurog A. şi Howells E. M., Fed. Proc., **23**, 149 (1964).

39. Taurog A. şi Howells E. M., J. Biol. Chem., **241**, 1329 (1966).
40. Tishler P. V. şi Ingbar S. H., Endocrinology, **76**, 295 (1965).
41. Tohata E., Fukuoka Igaku Zasshi, **50**, 4751 (1959).
42. YIP C.C. şi Hadley L. D., Biochim. Biophys. Acta, **122**, 406 (1966).
43. YIP C. C. şi Klebanoff S. J., Endocrinology, **70**, 931 (1962).

INHIBITORY EFFECT OF THE UROCHROME AND AQUEOUS LIVER EXTRACT ON ENZYMATIC IODINATION OF TYROSINE—^{14}C AND THYROGLOBULIN WITH THYROID PEROXIDASE AND H_2O_2 *IN VITRO*

SUMMARY

Iodination of tyrosine-^{14}C and thyroglobulin, as well as coupling of iodotyrosine with iodothyronine formation in the presence of thyroid peroxidase and H_2O_2 was studied *in vitro*.

Results obtained support the view that solubilized and partially purified thyroid peroxidase is very effective in catalyzing tyrosine -^{14}C and thyroglobulin iodination, as well as in the coupling reaction of iodotyrosine with iodotyronine formation.

Iodination of tyrosine-^{14}C and thyroglobulin in the presence of thyroid peroxidase is inhibited by low concentrations of urochrome and liver extract, but these products have effect on the coupling reaction of iodotyrosine.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 399 – 403 (1970)

ACTIVITATEA MIOKINASEI ŞI CREATINKINASEI ÎN MUŞCHII PERFUZAŢI CU 2, 4-DINITROFENOL

NATALIA MOLDOVEANU şi CORNELIU MEDEŞAN

Rezumat. — S-a determinat activitatea MK şi CK şi nivelul CP la muşchii gastrocnemieni de broască perfuzaţi la 20° C cu o soluţie Ringerbicarbonat cu sau fără 2,4-DNP 0,1 mM, şi stimulaţi electric.

Perfuzia cu 2,4-DNP, timp de 30 min determină o uşoară scădere a activităţii MK, o uşoară creştere a activităţii CK şi o scădere masivă a CP. În aceste condiţii stimularea electrică de 30 s nu modifică activităţile MK şi CK, dar stimularea de 5 min provoacă scăderi ale ambelor activităţi enzimatice.

După perfuzia cu 2,4-DNP timp de 60 min, cînd nivelul CP este aproape de zero, activitatea CK prezintă scăderi care se accentuează după stimularea electrică de 30 s şi mai ales de 5 min.

Uşoara creştere a activităţii CK după 30 min de perfuzie cu 2,4 — DNP nu poate fi responsabilă de scăderea drastică a CP.

Se ştie că pentru menţinerea nivelului ATP şi CP la o valoare constantă participă o serie de enzime, dintre care citäm miokinaza şi creatinkinaza, precum şi unele procese complexe, ca fosforilarea oxidativă şi glicoliza. Printre substanţele au ajutorul cărora s-au studiat unele procese metabolice energetice din muşchi a fost şi 2,4-dinitrofenolul. Această substanţă, pe lîngă efectul de decuplare a fosforilării oxidative [1], influenţează şi activitatea unei serii de enzime cum sînt ATP-aza [2], hexokinaza [3], fosforilaza [4], [5].

Într-o lucrare anterioară [6] am arătat că perfuzia muşchilor de broască cu o soluţie de 2,4- DNP în Ringer-bicarbonat provoacă o scădere drastică a CP pe cînd nivelul ATP şi capacitatea de a se contracta a muşchilor nu sînt afectate în aceste condiţii. La stimularea electrică a muşchilor perfuzaţi cu 2,4-DNP, s-a constatat o scădere a ATP, dependentă de timpul de stimulare[1].

Pentru a avea o imagine a mecanismului prin care ATP este menţinut la un nivel ridicat şi în condiţiile unei concentraţii deosebit de scăzute de CP, în lucrarea de faţă am urmărit activitatea miokinazei şi creatinkinazei în muşchiii perfuzaţi cu 2,4-DNP şi stimulaţi electric.

---

[1] ATP = adenozin 5′ — trifosfat; CP = creatinfosfat; 2,4-DNP = 2,4-dinitrofenol; MK = miokinază (E.C.2.7.4.3); CK = creatinkinază (E.C.2.7.3.2).

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe broaşte (*Rana ridibunda*) imobilizate prin distrugerea măduvei spinării, cu 12 ore înainte de perfuzie. Perfuziile s-au efectuat fie numai la unul din picioarele posterioare, celălalt constituind martorul neperfuzat, fie simultan la ambele picioare cu o soluţie Ringer-bicarbonat, cu sau fără 2,4-DNP (0,1 mM), barbotată cu azot. Durata perfuziei a fost de 30 sau 60 min, la temperatura de 20—22°C. După perfuzie, unul din muşchi s-a îngheţat, iar celălat s-a stimulat 30 s sau 5 min, la o intensitate de 2 mA, 5 imp/s, 5 ms/imp, 145 ms între impulsuri. Imediat după stimulare muşchiul s-a îngheţat şi mojarat în azot lichid şi apoi s-a omogenizat în KCl 0,1 M. Concentraţia proteică s-a stabilit cu metoda Lowry [7] modificată de Miller [8]. CP s-a dozat după Ennor şi Stocken [9]. Activitatea MK şi CK s-a determinat cu metoda Oliver [10] în condiţiile menţionate într-o lucrare anterioară [11]. Activitatea MK şi aceea a CK au fost exprimate în μmoli ATP formaţi/min/mg proteină.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea MK şi CK s-a determinat în următoarele condiţii experimentale :

— după perfuzia cu Ringer-bicarbonat a muşchilor timp de 30 sau 60 min şi stimularea lor electrică timp de 30 s sau 5 min ;

— după perfuzia cu 2,4-DNP în Ringer-bicarbonat timp de 30 sau 60 min şi stimularea electrică de 30 s sau 5 min.

Perfuzia cu Ringer-bicarbonat timp de 30 sau 60 min nu determină modificări ale activităţii MK sau CK din muşchi. Prin stimularea electrică de 30 s a muşchilor perfuzaţi cu Ringer-bicarbonat s-au pus în evidenţă uşoare creşteri ale activităţii ambelor enzime (figurile 1, 2, 3).

După 5 min de stimulare activităţile enzimelor rămîn ceva mai ridicate faţă de valorile de bază. În aceste condiţii experimentale, perfuzia cu Ringer-bicarbonat nu modifică nivelul ATP şi CP [6]. După stimularea electrică a muşchilor perfuzaţi cu Ringer-bicarbonat nivelul CP scade cu 30% după 30 s de stimulare, şi cu 65% după 5 min de stimulare (tabela 1). Notăm că în aceste condiţii nivelul ATP rămîne practic nemodificat [6].

Perfuzia muşchilor timp de 30 min cu o soluţie de 2,4-DNP în Ringer-bicarbonat determină o uşoară scădere a activităţii MK, o uşoară creştere a CK şi o scădere cu 80% a CP (tabela 1). La stimularea electrică de 30 s a muşchilor perfuzaţi cu 2,4-DNP timp de 30 min se constată că atît activitatea MK cît şi aceea a CK rămîn practic nemodificate, în comparaţie cu activitatea enzimatică a muşchilor perfuzaţi cu 2,4-DNP şi nestimulaţi. Prelungind timpul de stimulare la 5 min, se observă scăderi ale ambelor activităţi enzimatice (figurile 1, 2). În aceste condiţii, după 30 s de stimulare CP scade cu 10% iar după 5 min de stimulare cu 50% faţă de nivelul CP după perfuzia cu 2,4-DNP (tabela 1).

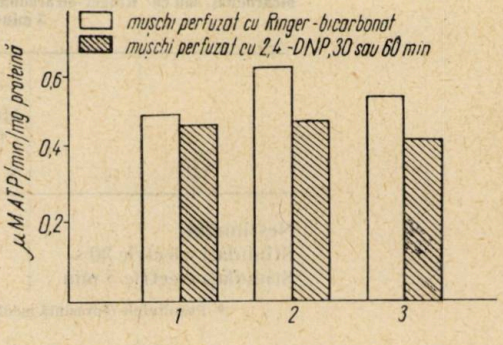


Fig. 1. — Activitatea miokinazei din mușchii perfuzați cu o soluție Ringer-bicarbonat cu sau fără DNP (0,1 mM), și stimulați electric.

1 — mușchi nestimulat; 2 — mușchi stimulat 30 secunde; 3 — mușchi stimulat 5 minute.

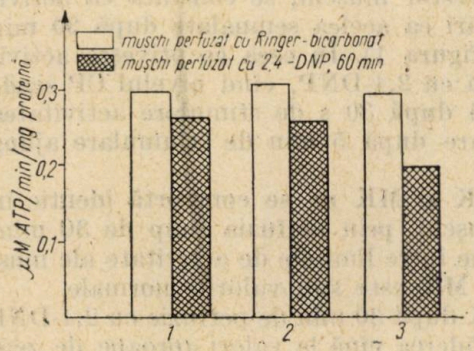


Fig. 2. — Activitatea creatinkinazei din mușchii perfuzați cu o soluție Ringer-bicarbonat cu sau fără 2,4-DNP și stimulați electric.

1 — mușchi nestimulat; 2 — mușchi stimulat 30 secunde; 3 — mușchi stimulat 5 minute.

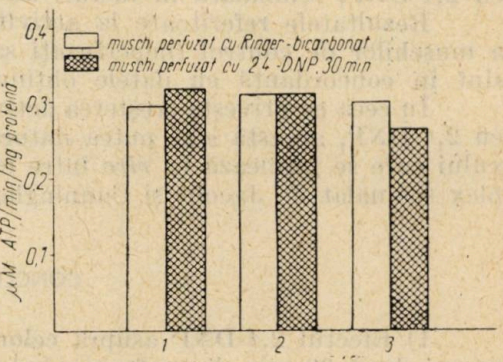


Fig. 3. — Activitatea creatinkinazei din mușchii perfuzați cu o soluție Ringer-bicarbonat cu sau fără 2,4-DNP și stimulați electric.

1 — mușchi nestimulat; 2 — mușchi stimulat 30 secunde; 3 — mușchi stimulat 5 minute.

Tabela 1

Scăderea creatinfosfatului la mușchii gastrocnemieni de broască perfuzați timp de 30 min cu o soluție de 2,4-DNP 0,1 mM în Ringer-bicarbonat, sau cu Ringer-bicarbonat, și stimulați electric 30 s sau 5 min*

	CPμmoli/g mușchi	
	Mușchi perfuzați cu Ringer	Mușchi perfuzați cu 2,4-DNP
Nestimulați	3,310	0,632
Stimulați electric 30 s	2,290	0,564
Stimulați electric 5 min	1,170	0,319

* Rezultatele reprezintă media a 6 determinări.

În urma perfuziei de 60 min cu o soluție de 2,4-DNP, atît activitatea MK, cît și a CK prezintă scăderi. Prin perfuzia de 60 min și stimularea de 30 s sau 5 min a acestor mușchi, se constată că activitatea MK prezintă aceleași modificări ca acelea semnalate după 30 min de perfuzie și stimulare electrică (figura 1). În ceea ce privește activitatea CK, la mușchii perfuzați o oră cu 2,4-DNP, cînd nivelul CP scade aproape de zero [6], se constată că după 30 s de stimulare activitatea enzimei prezintă ușoare scăderi, care după 5 min de stiumulare ajung pînă la 40% (figura 3).

Este de subliniat faptul că CK și MK nu se comportă identic în prezența a 2,4-DNP introdus în mușchi prin perfuzia timp de 30 min, deoarece în aceste condiții CK rămîne între limitele de activitate ale mușchilor martori sau crește, pe cînd MK este sub valorile normale.

Ușoara creștere a activității CK după 30 min de perfuzie cu 2,4-DNP nu poate fi însă responsabilă de scăderea pînă la valori aproape de zero a CP. Din acest motiv, încă nu putem să precizăm care este mecanismul prin care se produce această hidroliză a CP în urma perfuziei sau tratării cu 2,4-DNP, semnalată în lucrări anterioare [6], [13], [14].

Rezultatele referitoare la activitatea MK după 30 s de stimulare a mușchilor de control (neperfuzați sau perfuzați cu Ringer-bicarbonat) sînt în concordanță cu datele obținute într-o lucrare anterioară [12].

În ceea ce privește creșterea activității CK după 30 min de perfuzie cu 2,4-DNP, aceasta s-ar putea datora efectului de protecție al complexului care se formează *in vivo* între creatină, Mg-ADP și miozină, complex semnalat de Jacobs și Cunningham [15].

CONCLUZII

1) Efectul 2,4-DNP asupra celor două enzime studiate este diferit numai după 30 min de perfuzie, cînd s-a pus în evidență o ușoară creștere a activității CK și o ușoară scădere a activității MK.

2) Stimularea electrică de 30 s în condițiile amintite nu modifică activitatea CK și MK față de activitatea enzimatică a mușchilor perfuzați cu DNP și nestimulați.

3) Stimularea de 5 min provoacă scăderi ale ambelor activităţi enzimatice.

4) Perfuzia de 60 min cu 2,4-DNP determină o scădere a activităţii CK atît la muşchii stimulaţi, cît şi la cei nestimulaţi.

Prezentat la redacţie la 10 iulie 1970

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. C. Weinbach, J. Garbus, Nature, **221**, 1016 (1969).
2. H. M. Levy, P. D. Leber, E. M. Ryan, J. Biol. Chem., **238**, 3654 (1963).
3. M. A. Grillo, M. Cafiero, Biochim. Biophys, Acta, **82**, 92 (1964).
4. C. Medesan, D. Tănăsescu, Rev. roum. Biochim., **7** (1970).
5. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, Rev. roum. Biochim., **7** (1970).
6. C. Medesan, N. Moldoveanu, Rev. roum. Biochim,. **6**, 43 (1969).
7. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, L. A. Farr, R. J. Radwall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
8. G. L. Miller, Anal. Chem., **31**, 946 (1959).
9. A. H. Ennor, L. A. Stocken, Biochem, J., **42**, 557 (1948).
10. J. T. Oliver, Biochem. J., **61**, 116 (1955).
11. N. Moldoveanu, Rev., roum. Biochim., **7**, 123 (1970).
12. N. Moldoveanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 47 (1967).
13. D. F. Cain, A. A. Infante, R. E. Daevis, Nature, **196**, 214 (1962).
14. C. Medesan, Rev. roum. Biochim., **3**, 363 (1966).
15. G. Jacobs, W. Cunningham, Biochemistry, **7**, 143 (1968).

MIOKYNASE AND CREATINKINASE ACTIVITIES IN MUSCLES PERFUSED WITH 2,4-DINITROPHENOL

SUMMARY

The MK and CK activities and CP level in electrically stimulated frog hind limb muscles perfused at 20 °C with Ringer-bicarbonate solution, with or without 0.1 mM 2,4-DNP, were investigated.

The perfusion with 2,4-DNP solution for 30 min determines a slight decrease in the MK activity, a slight increase in the CK activity and a massive decrease in CP. Under these conditions the MK and CK activities are not influenced by 30 sec. electrical stimulation, but they decrease after 5 min. stimulation.

An hour perfusion with 2,4-DNP, when the CP level is almost to zero, leads to a decrease in the CK activity, which is more marked after 30 sec. and 5 min. electrical stimulation.

The slight increase in CK activity after 30 min perfusion with 2,4-DNP cannot account for the drastic decrease in CP.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 405 – 410 (1970)

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTELE SUPERIOARE

IV. PIGMENȚII CAROTINOIDICI DIN PLANTE SEMIPARAZITE

G. NEAMȚU și C. BODEA

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotinoidici din unele plante semiparazite din familiile *Loranthaceae*, *Santalaceae* și *Scrophulariaceae*. Sub aspect cantitativ, atît în frunze cît și în flori predomină carotinoidele cu structură α-iononică. Raportul dintre luteină și β-carotină, care sînt principalele carotinoide foliare, este mai mare la plantele semiparazite decît la plantele gazdă (plante autotrofe) și poate constitui un criteriu chemotaxonomic.

Este cunoscut că în natură, alături de plantele autotrofe, care reprezintă marea majoritate a plantelor superioare, există și plante semiparazite, care își sintetizează o parte din substanțele organice prin fotosinteză, iar o parte le iau, împreună cu apa și substanțele minerale, de la planta gazdă [1] — [3].

Întrucît plantele semiparazite și, în general, toate plantele heterotrofe prezintă anumite particularități (biochimice, fiziologice, morfologice etc.) față de plantele autotrofe, este interesant a se cunoaște în ce măsură aceste particularități se reflectă în natura pigmenților carotinoidici. De asemenea, este important a se stabili în ce măsură carotinoidele pot contribui la clarificarea unor procese biochimice, chemotaxonomice și fiziologice la aceste plante.

Dintre plantele semiparazite, sub aspectul pigmenților carotinoidici s-a cercetat pînă acum numai *Viscum album* [4].

În prezenta lucrare s-a urmărit determinarea pigmenților carotinoidici dintr-un număr relativ mare de plante semiparazite, diferite sub aspectul coloritului floral, precum și stabilirea unui criteriu chemotaxonomic pentru acest grup de plante. S-a urmărit, de asemenea, cunoașterea influenței pe care plantele gazdă o au asupra naturii și cantității pigmenților carotinoidici din *Loranthus europaeus*.

MATERIAL ȘI METODE

Plantele semiparazite cercetate cu indicarea culorii florii și a locului de recoltare, sînt trecute în tabela 1.

Pentru determinarea pigmenților carotinoidici s-a folosit material proaspăt (frunze, flori, fructe), atît din plantele semiparazite cît și din plantele gazdă.

Tabela 1

Nr. crt.	Plante semiparazite	Culoarea	Locul de recoltare
a	*Familia Loranthaceae*	galben-verzuie	Hoia-Cluj
1	*Loranthus europaeus Jacq.*		Baia Mare-Maramureș
b	*Familia Santalaceae*		
2	*Thesium linophyllon L.*	albicioasă	Hoia-Cluj
3	*Thesium ramosum Hayne*	albicioasă	Gherla-Jud. Cluj
c	*Familia Schrophulariaceae*		
4	*Bartschia alpina L.*	violacee	Munții Ceahlău-P. Neamț
5	*Euphrasia stricta Host.*	violacee	Finațe-Cluj
6	*Euphrasia tatarica Fisch.*	alb-violacee	Feleac-Cluj
7	*Melampyrum bihariense Kern.*	galben-aurie	Făget-Cluj Lăpuș-Maramureș
8	*Melampyrum silvaticum L.*	galben-aurie	Munții Retezat
9	*Melampyrum pratense L.*	gălbuie	Făget-Cluj
10	*Odontites serotina Rchb.*	roșie	Făget-Cluj
11	*Ortantha lutea Kern.*	galbenă	Hoia-Cluj
12	*Pedicularis comosa L.*	galbenă	Cheile Turzii-Cluj
13	*Pedicularis exaltata Bess.*	gălbuie	Făget-Cluj
14	*Pedicularis verticillata L.*	roșie	Munții Retezat
15	*Rhinanthus major Ehrh.*	galbenă	Mănăștur-Cluj
16	*Rhinanthus minor L.*	galben-aurie	Mănăștur-Cluj
17	*Tozzia alpina L.*	galbenă	Munții Ceahlău-P. Neamț

Extragerea carotinoidelor s-a făcut cu amestec de eter de petrol — — acetonă — metanol 5 : 3 : 2.

Separarea pigmenților carotinoidici s-a făcut prin cromatografia pe coloană (30 × 3,5 cm), utilizînd ca adsorbant zahăr pisat, puternic tasat, precum și amestec de MgO cu nisip fin. Developarea coloanelor cromatografice s-a făcut cu amestec de eter de petrol și benzen pînă la 35%. Pentru cromatograme de amestec cu pigmenți carotinoidici extrași din alte plante s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizînd ca adsorbant MgO, iar ca developant amestec de eter de petrol-benzen-acetonă 6 : 3 : 1.

Identificarea și determinarea pigmenților carotinoidici s-a făcut prin metode cromatografice, spectroscopice și colorimetrice, ca și în lucrările anterioare [4] — [6].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dintre plantele din familia *Loranthaceae*, alături de *Viscum album* face parte și *Loranthus europaeus Jacq.*, semiparazit ce trăiește în mod deosebit pe plante din genul *Quercus*. În apropierea orașului Baia Mare s-a găsit semiparazitar și pe castanul comestibil (*Castaneia sativa*).

Loranthus europaeus trăiește semiparazit numai pe plante lemnoase, la fel ca și *Viscum album* [4], dar, spre deosebire de acesta, are frunzele căzătoare și mult mai subțiri.

Determinarea pigmenților carotinoidici din frunzele de *Loranthus europaeus*, semiparazitar pe *Quercus robur* și *Castanea sativa*, se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Conținutul de carotinoide al frunzelor de *Loranthus europaeus* semiparazitar pe *Quercus robur* și *Castanea sativa* (mg/100 g frunze proaspete)

Carotinoide	*Quercus robur*		*Castanea sativa*	
	mai	septembrie	mai	septembrie
a) *Cu structură* α				
α-Carotina	0,92	0,68	0,84	0,58
luteina	2,05	1,76	2,15	1,85
luteina ester	0,65	0,90	0,72	0,96
eloxantina	0,30	0,40	0,45	0,50
Total	3,92	3,74	4,16	3,89
b) *Cu structură* β				
β-carotina	1,15	0,95	1,25	1,00
criptoxantina	0,25	0,16	0,15	0,08
violaxantina	0,70	0,83	0,50	0,68
Total	2,10	1,94	1,90	1,76

În frunzele de *Loranthus europaeus* se găsesc carotinoide foliare comune. Sub aspect cantitativ predomină cele cu structură α- iononică. Raportul dintre luteină și β- carotină — principalele carotinoide foliare — este mai mare decît la frunzele plantelor gazdă (plante autotrofe), ceea ce poate constitui un criteriu chemotaxonomic.

Din determinările efectuate reiese că între pigmenții carotinoidici din frunzele de *Loranthus europaeus* recoltate de pe cele două plante gazdă nu există deosebiri calitative, cu numai cantitative, ce nu au o semnificație deosebită. La fel ca și la *Viscum album* [4], nici în cazul acestei specii plantele gazdă nu influențează natura carotinoidelor din planta semiparazită.

Carotinoidele din planta semiparazită se deosebesc în general de carotinoidele din planta gazdă. Determinarea carotinoidelor din frunzele de *Quercus robur* și *Castanea sativa* se prezintă în tabela 3.

Tabela 3

Conținutul de carotinoide al frunzelor de *Quercus robur* și *Castanea sativa* (mg/100 g frunze proaspete)

Carotinoide	*Quercus robur*		*Castanea sativa*	
	mai	septembrie	mai	septembrie
a) *Cu structură* α				
α-carotină	0,16	0,10	0,30	0,24
luteina	1,20	1,15	1,14	1,08
Total	1,36	1,25	1,44	1,32
b) *Cu structură* β				
β-carotină	1,50	1,24	1,40	1,18
criptoxantină	0,08	0,05	0,17	0,14
violaxantină	0,25	0,32	0,20	0,26
neoxantină	0,15	0,18	—	—
Pigment neidentificat	0,40	0,32	—	—
Total	2,38	2,11	1,77	1,58
Chinone	—	—	1,20	1,20

În frunzele plantelor gazdă predomină carotinoidele cu structură β-iononică, invers ca la plantele semiparazite. Dintre carotinoidele cu structură α-ionnoică, s-au identificat numai α-carotina și luteina. Raportul dintre luteină și β- carotină este sub 1.

În frunzele de *Quercus robur* s-a pus în evidență un pigment carotinoidic de culoare roșietică, a cărui structură încă nu s-a putut determina. În frunzele de *Castanea sativa* apar în cantitate mare chinone.

În florile de *Loranthus europaeus* s-au identificat prin cromatografia în strat subțire β- carotina, luteina (ester), luteina liberă și eloxantina.

În fructele coapte de *Loranthus europaeus* predomină carotinoidele cu structură β-iononică, ce imprimă fructelor o culoare portocalie. Alături de β- carotină (2,16 mg) s-au identificat criptoxantina (0,52 mg), zeaxantina (1,08 mg) precum și luteina (1,24 mg/100 g fructe proaspete), cu structură α-iononică.

Cu toate că *Viscum album* și *Loranthus europaeus* semiparazitează plante lemnoase, între aceste două specii există deosebiri sub aspectul pigmenților carotinoidici. Aceste deosebiri se datoresc însă naturii diferite a speciilor semiparazite și nu influenței plantelor gazdă.

Dintre plantele semiparazite, un grup mult mai numeros și mai variat îl reprezintă plantele ierboase din familia *Santalaceae* și *Schrophulaceae*. Ele sînt larg răspîndite în natură și semiparazitează în special plante din familia *Gramineae* și *Leguminosae*.

În frunzele plantelor semiparazite ierboase se găsesc în general carotinoide foliare comune țesuturilor verzi. Sub aspect cantitativ predomină carotinoidele cu structură α - iononică. Raportul dintre luteină și β - carotină este mare și la aceste plante, fiind peste 1, deși ele își procură o cantitate însemnată de substanțe organice prin fotosinteză [1], [7], [8]. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 4.

Tabela 4

Conținutul de carotinoide din frunzele unor plante semiparazite ierboase

Specia	Total carotinoide mg/100 g frunze proaspete	α-carotina	β-carotina	criptoxantina	luteina	eloxantina	violaxantina
		Procente din totalul carotinoidelor					
1. *Bartschia alpina*		—	25		60	10	
2. *Euphrasia stricta*	2,10	—	20	—	55	10	5
3. *Euphrasia tatarica*	2,24	—	30	5	60	10	10
4. *Melampyrum bihariense*	1,96	5	25	—	55	10	—
5. *Melampyrum silvaticum*	2,85	5	20	—	60	10	5
6. *Melampyrum pratense*	3,10	5	25	—	60	6	5
7. *Odontites serotina*	2,63	—	25	—	60	—	4
8. *Orthantha lutea*	2,14	8	25	5	55	8	10
9. *Pedicularis comosa*	2,76	6	22	—	55	15	4
10. *Pedicularis exaltata*	2,88	—	25	—	55	—	—
11. *Pedicularis verticillata*	2,67	—	30	5	55	15	10
12. *Rhinanthus major*	2,90	5	25	5	60	5	—
13. *Rhinanthus minor*	3,18	5	25	—	55	10	5
14. *Thesium ramosum*	2,97	—	30	—	60	—	5
15. *Thesium linophyllon*	1,82	—	25	—	60	—	10
16. *Tozzia alpina*	1,65	5	20	5	55	10	10
	2,36			—			10

Întrucît unele plante semparazite ierboase au flori relativ bine dezvoltate, s-au determinat în continuare pigmenţii carotinoidici din florile unor specii din genul *Rhinanthus* şi *Melampyrum*. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 5.

Tabela 5

Conţinutul de carotinoide din florile unor specii de *Rhinanthus* şi *Melampyrum* (mg/100 g flori proaspete)

Carotinoide	*Rhinanthus*		*Melampyrum*	
	Major	Minor	Silvaticum	Bihariense
a) *Cu structură* α				
luteină	1,20	1,40	0,80	0,50
luteină ester	0,20	0,40	1,58	1,00
eloxantină	0,35	—	0,40	0,32
Total	1,75	1,80	2,78	1,82
b) *Cu structură* β				
β-Carotină	0,80	0,56	0,50	0,28

Din determinările efectuate reiese că şi în florile acestor plante predomină carotinoidele cu structură α - iononică. Pigmentul principal este tot luteina, care se găseşte însă atît sub formă liberă cît şi sub formă de ester. La speciile de *Rhinanthus* predomină luteina liberă, iar la cele de *Melampyrum luteina* sub formă de ester. Dintre carotinoidele cu structură β - iononică s-a identificat numai β - carotina. În florile plantelor semiparazite carotinoidele cu structură β - iononică se găsesc în cantitate mai mică decît în frunze. Raportul dintre luteină şi β - carotină este mare şi în flori şi poate constitui de asemenea un criteriu chemotaxonomic.

Prin cromatografia în strat subţire s-au determinat pigmenţii carotinoidici (calitativ şi cantitativ) şi din florile altor plante semiparazite, cu colorit floral diferit. La toate speciile cercetate predomină carotinoidele cu structură α - iononică. Raportul dintre luteină şi β - carotină este 2,3 şi chiar 4 : 1. Determinările cantitative sînt trecute în tabela 6.

Tabela 6

Conţinutul de carotinoide din florile unor specii semiparazite cu colorit floral diferit

Specia	Total carotinoide mg/100 g	α-carotina	β-carotina	Criptoxantina	luteina	flavoxantina	eloxantina	violaxantina
		Procente din totalul carotinoidelor						
1. *Bartschia alpina*	1,60	—	20	10	55	—	—	15
2. *Euphrasia stricta*	1,80	—	25	15	60	—	—	—
3. *Euphrasia tatarica*	1,55	—	30	—	70	—	—	—
4. *Melampyrum pratense*	2,70	5	12	—	58	10	15	—
5. *Odontites serotina*	1,65	—	25	15	50	—	—	10
6. *Orthontha lutea*	2,40	6	15	—	45	10	14	10
7. *Pedicularis comosa*	3,20	8	20	—	50	—	10	12
8. *Pedicularis exaltata*	2,45	—	15	—	60	15	10	—
9. *Pedicularis verticillata*	2,10	—	25	5	55	—	—	15
10 *Thesium linophyllon*	1,38	—	25	—	60	—	15	—
11. *Thesium ramosum*	1,50	—	20	—	65	—	15	—
12. *Tozzia alpina*	2,80	5	15	—	55	10	15	—

CONCLUZII

În plantele semiparazite cercetate, predomină atît în flori cît și în frunze carotinoidele cu structură α - iononică.

Raportul dintre luteină și β - carotină este mai mare la plantele semiparazite decît la plantele gazdă și poate constitui un criteriu chemotaxonomic.

Între pigmenții carotinoidici din plantele semiparazite și cei din planta gazdă există în general deosebiri atît calitative cît și cantitative. Pigmenții carotinoidici din plantele semiparazite nu depind de planta gazdă.

Prezentat la redacție la 19 mai 1970.

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
str. Mănăștur, nr. 3, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. E. Pop, N. Sălăgeanu, St. Peterfi, H. Chirilei, *Manual de Fiziologia plantelor*, vol. 2, Edit. de stat didactică și pedagogică, București, 1960, p. 389.
2. T. W. Goodwin, *Stravnitelinaia biohimia karotinoidov*, Izdatelistvo Inostrannoi Literaturi, Moscova 1954, p. 14 și 119.
3. T. Swain, *Comparative Phytochemistry*, Academic Press, London and New York, 1966, p. 121.
4. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **13**, 59 (1970).
5. G. Neamțu, C. Bodea, Rev. roum., Biochim., **6**, 157 (1969).
6. G. Neamțu, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **6**, 227 (1969).
7. W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. XI, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, p. 179.
8. W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. X, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, p. 186.

CHEMOTAXONOMIC STUDIES ON HIGHER PLANTS. IV. CAROTINOID PIGMENTS OF SEMI-PARASITIC PLANTS

SUMMARY

The carotinoid pigment content of some parasitic plants of *Loranthaceae*, *Santalaceae* and *Schrophulariaceae* families has been investigated.

Quantitatively, both in leaves and flowers, the carotinoides of the α - ionone structure prevail.

The ratio of lutein to β - carotenoids (which are the main foliar carotinoides) is greater in the semi-parasitic plants than in host (autotrophic plant) and may be considered as a chemotaxonomic criterion.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 411 – 416 (1970)

METABOLISMUL OXIDATIV AL LEUCOCITELOR PERIFERICE ŞI REJECŢIA GREFEI ALOGENICE DE RINICHI

CRISTIANA RĂDULESCU

Rezumat. — În experienţele pe cîini cu grefe alogenice de rinichi, s-au investigat periodic postoperator următorii parametri ai metabolismului oxidativ în leucocitele periferice : a) oxidarea izocitratului, α-oxoglutaratului, glutamatului şi succinatului ; b) efectul DNF asupra oxidării acestor substraturi ; c) activitatea LDH, SDH, ATP-azei, fosfatazelor acidă şi alcalină şi UDPG-DH. S-au înregistrat modificări semnificative (cu caracter depresiv sau, dimpotrivă, stimulativ) la majoritatea parametrilor investigaţi. Se discută relaţiile posibile dintre aceste modificări şi reacţia imunologică de intoleranţă faţă de aceste grefe.

Implicaţia leucocitelor în reacţia organismului împotriva grefelor alogenice şi a grefelor xenogenice este indiscutabilă [22], [26] şi, din punct de vedere biochimic, ea are ca expresie importante modificări ale metabolismului oxidativ şi lipidoprotidic leucocitar apărute în cursul rejecţiei unor grefe alogenice [16], [18], [20]. Practic, aceste constatări au condus la utilizarea cu rezultate satisfăcătoare a unor seruri antileucocitare, ca serul antimacrofagic [10], [24] sau serul antilimfocitar [7], [13], în combaterea rejecţiei acestui tip de grefe.

După opinia noastră, studiul metabolismului leucocitelor periferice în cursul rejecţiei organului transplantat ar putea furniza elemente importante pentru elucidarea aspectelor biologice necunoscute, atît ale intervenţiei acestor celule în acest proces, cît şi ale mecanismului de acţiune al serurilor antileucocitare în acesată împrejurare. Lucrarea de faţă se înscrie în acest punct de vedere.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele au fost efectuate pe cîini cu grefă alogenică de rinichi. S-a folosit tehnica de grefare heterotopică a rinichiului, propusă de Merrill şi colab. [14], căreia i s-au adus modificări minore [18], [19]. Animalele au fost supuse unui tratament postoperator standard, fără medicamente imunosupresoare. Înainte de operaţie şi, periodic, după operaţie (la interval de 3 — 4 zile), s-au prelevat probe de sînge venos periferic, pentru studiul metabolismului oxidativ al leucocitelor.

În experiențele prevăzute pentru studiul metabolizării acizilor tricarboxilici, izolarea leucocitelor s-a făcut după metoda lui Fallon și colab. [5], iar pentru celelalte experiențe după metoda utilizată de Fleisher [6].

Au fost investigați următorii parametri privind metabolismul oxidativ al leucocitelor izolate din sîngele periferic al acestor animale: 1) oxidarea unor substraturi din ciclul lui Krebs și cicluri conexe (izocitrat, α-oxoglutarat, glutamat și succinat), folosindu-se metodele lui Beck și Valentine [1], Gertler și Mancici [8] și Patkin și Masoro [15], cu unele modificări personale; 2) efectul 2,4 - dinitrofenolului (DNF) asupra oxidării acestor substraturi; 3) activitatea unor enzime implicate în oxidarea acizilor tricarboxilici și fosforilarea oxidativă, ca dehidrogenaza lactică (LDH) și dehidrogenaza succinică (SDH), după metodele recomandate de Colowick și Kaplan [3], fosfatazele, acidă și alcalină, după metoda lui Valentine și Beck [25] și adenozintrifosfataza (ATP - aza), după metoda lui Kielley [12]; 4) activitatea dehidrogenazei uridindifosfoglucozei (UDPG - DH), după metoda lui Strominger și colab. [23].

REZULTATE

Oxidarea substraturilor din ciclul lui Krebs și efectul DNF asupra acestui proces în leucocitele periferice au prezentat următoarele modificări: a) depresiunea semnificativă a oxidării izocitratului ($p < 0,05$), a cărei valoare minimă a fost observată după 9 — 12 zile de la transplantarea rinichiului și apariția unor variații nesemnificative ale oxidării α - oxoglutaratului, glutamatului și succinatului; b) inhibiția oxidării α - oxoglutaratului și stimularea oxidării succinatului de către DNF ($p < 0,10$), fără influențarea oxidării izocitratului și a glutamatului, în intervalul, menționat mai sus, după transplantarea alogenică a rinichiului (tabela 1).

Activitatea LDH și activitatea SDH în leucocitele periferice ale receptorilor de alogrefă renală au scăzut progresiv în primele 15 zile postoperator ($p < 0,05$), menționîndu-se la un nivel scăzut și în următoarele 15 zile (tabela 2).

Activitatea dehidrogenazei uridindifosfoglucozei în leucocitele periferice ale receptorilor de alogrefă renală (tabela 2) s-a intensificat în mod evident în primele 5 zile postoperator. Ea a crescut de aproape 3 ori în această perioadă și s-a menținut, în mod semnificativ ($p < 0,10$), la un nivel ridicat încă 14—15 zile, adică în perioada acută a rejecției.

Activitatea ATP-azei și aceea a *fosfatazei alcaline* în leucocitele periferice au prezentat variații nesemnificative după transplantarea rinichiului (tabela 2). În schimb, a fost observată în această circumstanță intensificarea activității fosfatazei acide. Creșterea activității acestei enzime a devenit semnificativă începînd din a șasea zi postoperator ($p < 0,05$) și a durat peste 30 zile (tabela 2).

Tabela 1

Oxidarea unor substraturi din ciclul lui Krebs de către leucocitele din sîngele periferic la ciini cu grefe alogenice de rinichi (mm³ O_2/30 milioane leucocite/30 min)*

Mediul de reacţie **		Control	Zile după transplantare						
			2–5	6–8	9–12	13–15	16–20	21–25	26–31
Fără DNF	Izocitrat	9,6 ±1,58	8,0 ±1,46	8,2 ±1,12	7,8 ±1,10	9,7 ±1,43	9,5 ±1,95	11,0 ±1,92	7,7 ±1,52
	α-Oxoglutarat	7,3 ±0,72	7,9 ±1,46	8,1 ±1,24	8,0 ±0,86	7,9 ±0,70	8,5 ±1,35	9,4 ±1,83	8,5 ±1,65
	Glutamat	8,7 ±0,74	7,3 ±1,16	8,3 ±1,10	7,4 ±0,82	7,9 ±0,78	8,2 ±1,31	10,1 ±1,26	7,8 ±1,18
	Succinat	7,7 ±0,42	8,0 ±1,51	8,3 ±0,87	8,2 ±0,86	8,1 ±0,99	8,9 ±1,51	10,6 ±1,30	9,9 ±1,33
Cu DNF	Izocitrat	7,4 ±1,19	6,2 ±0,80	7,5 ±1,14	7,4 ±1,02	8,5 ±1,11	7,5 ±1,36	8,7 ±0,51	7,9 ±1,28
	α-Oxoglutarat	9,3 ±1,48	7,8 ±1,37	7,8 ±1,06	7,6 ±1,05	7,9 ±0,52	7,8 ±1,38	8,9 ±0,98	8,2 ±2,22
	Glutamat	8,2 ±0,91	7,2 ±1,27	7,7 ±1,09	7,6 ±0,76	7,5 ±1,21	7,9 ±1,16	8,9 ±1,10	7,4 ±2,27
	Succinat	9,8 ±1,23	8,3 ±1,38	10,1 ±1,23	11,9 ±2,01	10,5 ±1,56	10,5 ±1,58	11,5 ±1,98	11,1 ±2,11

* Fiecare valoare reprezintă media a 10 – 20 determinări.

** Fiecare vas de reacţie a conţinut : tampon fosfat pH 7,4 – 30 μ mol, substrat (izocitrat – 10 μmol, α-oxoglutarat – 20 μ mol, glutarat – 20 μ mol, succinat – 20 μ mol), ATP – 3 μ mol, NAD – 2μ mol, $MgCl_2$ – 20 μ mol, suspensie leucocitară. Preincubaţia s-a făcut timp de 15 min sub amestec de O_2 (94 %) şi CO_2 (6%).

DISCUŢII

După transplantarea alogenică a rinichiului, parametrii metabolismului oxidativ al leucocitelor periferice, studiaţi de noi, s-au modificat aproape în totalitate. Astfel, a fost evidenţiată creşterea activităţii fosfatazei acide şi a UDPG-DH, paralel cu deprimarea activităţii LDH şi SDH şi a oxidării unor substraturi din ciclul lui Krebs în perioada de rejecţie a organului transplantat. Ultimele noastre observaţii concordă cu acelea ale altor autori [16], [17], [18] şi ilustrează faptul că rejecţia organului transplantat este însoţită de remanieri importante ale metabolismului oxidativ leucocitar.

În ceea ce priveşte fosfataza alcalină este surprinzătoare lipsa modificării activităţii sale în leucocitele periferice în această circumstanţă, pentru că această enzimă leucocitară (sau grup de enzime) s-a dovedit foarte sensibilă la condiţii de *stress*, ca infarctul miocardic, traumatismul operator, infecţia piogenă şi alte infecţii (care implică hiperfuncţia hipofizo-suprarenaliană) şi areactivă sau deprimată în afecţiuni de tip neoplazic, ca leucemiile cronice [2]. Această observaţie sugerează că între metabolismul leucocitului neoplazic şi acela al leucocitului implicat în procesul de rejecţie a grefei de organ normal există unele asemănări.

O altă explicaţie a acestei observaţii ar consta în faptul că fosfatazele acide şi alcaline se distribuie în mod distinct între limfocite şi granulocite, cele dintîi fiind conţinute de limfocite, iar cele de pe urmă de leucocite [9],

Tabela 2

Activitatea unor dehidrogenaze ale acizilor tricarboxilici, a dehidrogenazei uridindifosfoglucozei, a adenozintrifosfatazei şi a fosfatazelor în leucocitele din sîngele periferic la cîini cu grefe alogenice de rinichi

Enzima	Control	Zile după transplantare					
		2–5	6–8	9–12	13–15	16–20	21–31
LDH (u.e./6 × 10^6 leucocite)	3,68 ±0,20	3,66 ±0,22	3,56 ±0,28	2,39 ±0,37	1,59 ±0,67	2,63 ±0,36	1,97 ±0,35
SDH (u.e./6 × 10^6 leucocite)	4,25 ±0,20	3,99 ±0,14	2,85 ±0,20	2,92 ±0,20	2,50 ±0,54	2,48 ±0,36	2,18 ±0,36
		0–5	6–10	11–15	16–20	21–25	26–30
UDPG-DH (µmol UDPG/mg proteină)	0,081 ±0,020	0,230 ±0,030	0,216 ±0,052	0,214 ±0,051	0,160 ±0,051	0,106 ±0,043	0,066 ±0,026
ATP-ază (µg P/mg proteină/30 min)	11 ±1	18 ±2	17 ±2	20 ±1	16 ±1	19 ±1	16 ±1
Fosfatază alcalină (µg P/mg proteină/60 min)	25 ±9	40 ±8	40 ±5	40 ±5	30 ±3	40 ±4	40 ±4
Fosfatază acidă (µg P/mg proteină/60 min)	40 ±8	60 ±12	80 ±10	80 ±5	70 ±8	70 ±5	70 ±4

LDH, dehidrogenază lactică; SDH, dehidrogenază succinică; UDPG-DH, dehidrogenaza uridindifosfoglucozei; ATP-ază, adenozintrifosfatază.

iar intervenţia limfocitelor în rejecţia alografelor este mult mai importantă decît aceea a granulocitelor. Datele noastre arată, de altfel, că activitatea fosfatazei acide în leucocitele periferice creşte semnificativ în cursul acestui proces. Dar activitatea acestei enzime s-a dovedit a fi crescută şi în leucocitul periferic la bolnavii cu leucemie mieloidă cronică [27], ceea ce ar confirma presupunerea noastră asupra unor similitudini metabolice între leucocitul neoplazic şi leucocitul devenit „imunocompetent" după transplantarea unui organ normal.

Aceste similitudini îşi găsesc expresia nu numai în activitatea fosfatazelor, care, ca şi ATP-aza, sînt larg implicate în metabolisme diverse (hidrocarbonaţi, lipide, acizi nucleici), ci şi în activitatea unor enzime cu implicaţii metabolice mai restrînse, ca SDH, LDH şi UDPG-DH. De altfel, în lucrări anterioare [20], [21] noi am evidenţiat cîteva modificări ale metabolismului lipidoprotidic leucocitar caracteristice pentru rejecţia alografei renale (scăderea conţinutului de lipide totale, creşterea conţinutului de acizi graşi polinesaturaţi, scăderea conţinutului de colesterol în fracţiunea β_1-lipoproteică şi creşterea conţinutului de acizi graşi esterificaţi în fracţiunile lipoproteice α_1 şi α_2), precum şi modificări importante în sinteza hepatică a proteinelor şi acizilor nucleici în cursul rejecţiei alografei de piele (intensificarea sintezei proteinelor, ARN fiind preferenţial implicat în acest proces).

În ceea ce priveşte UDPG-DH, care catalizează reacţia dintre UDPG şi NAD, formatoare de NADH şi acid uridindifosfoglucuronic, s-a stabilit că ea este, de fapt, un element important în biosinteza acidului hialuronic, pentru că acidul uridindifosfoglucuronic este un precursor în acest proces şi în aceea a acidului glucuronic, pentru că acidul uridindifosfoglucuronic generează prin pirofosforoliză UTP şi glucurono-1-fosfat [11], o moleculă foarte reactivă. Aceste date, conjugate cu observaţia prezentă, potrivit căreia în cursul rejecţiei alografei renale activitatea UDPG-DH se intensifică în leucocitele periferice, sugerează că în leucocit are loc în această circumstanţă o intensă sinteză de acid glucuronic şi, implicit, o intensă activitate de glucuronoconjugare. Principial, această observaţie pare a fi foarte interesantă, pentru că permite să se presupună că leziunile organului transplantat, consecutive reacţiei antigen-anticorp, se datoresc, cel puţin în parte, unuia sau mai multor metaboliţi, produşi în exces, care pot fi neutralizaţi prin conjugare.

Ţinem să mulţumim tov. dr. E. Păuşescu, sub îndrumarea căruia a fost efectuată această lucrare.

Prezentat la redacţie la 13 iulie 1970

Laboratorul de Patologie Experimentală,
Transplantare de Organe şi Investigaţii
Clinice Speciale ale Spitalului
Clinic Fundeni, Bucureşti.

BIBLIOGRAFIE

1. Beck W. S., Valentine V. N., Cancer Res. **12**, 818 (1952).
2. Cline M. J., Physiol. Rev. **45**, 674 (1965).
3. Colowick S. P., Kaplan N. O., *Methods of Enzymology*, vol. 1, Academic Press, New Yok, 1955, p. 449 şi 723.
4. Dyminski J. W., Argyris B. F., Transplantation, **6**, 595 (1969).
5. Fallon H. J., Frei E., Davidson J. D., Trier J. S., Burk D., J. Lab. Clin. Med., **59**, 779 (1962).
6. Fleisher G. A., în *Methods in Medical Research* (WARREN J. V.). The Year Book Publishers, vol. 7, Chicago, 1958, p. 151.
7. Fries D., Cahiers Méd. Lyonnais, **46**, 1053 (1970).
8. Gertler M. M., Mancini D., Am. J. Physiol., **200**, 355 (1961).
9. Haight W. F., Rossiter R. J., Blood **5**, 267 (1950).
10. Hirsch M. S., Gary G. W., Murphy F. A., J. Immunol., **102**, 656 (1969).
11. Imsande J., Handler P., în *The Enzymes* (BOYER P. D., LARDY H., MYRBÄCK K.) Academic Press, New York, vol. 5, 1961, p. 281.
12. Kielley W. W., in Methods in *Enzymology* (COLOWICK S. P., KAPLAN N. O.), Academic Press, New York, vol. 2, 1955, p. 593.
13. Lance E. M., Medawar P. B., Transpl. Proc. **1**, 629 (1969).
14. Merrill J. P., Murray J. E., Harrison J. H., Guild W. R., J. Am. Med. Ass., **160**, 277 (1956).
15. Patkin J., Masoro E. J., Am. J. Physiol., **199**, 201 (1960).
16. Păuşescu E., Dincă A., Negrea F., Florescu R., Rev. Roum. Physiol., **2**, 427 (1965).
17. Păuşescu E., Dincă A., Chirvasie R., Rev. Roum. Physiol., **4**, 283 (1967).
18. Păuşescu E., Dincă A., Chirvasie R., Ztschr. Innere Med., Leipzig, **23**, 33 (1968).
19. Păuşescu E., Lugojan R., Negrea F., Folia Haematol,. Berlin, **90**, 241 (1968).
20. Păuşescu E., Rădulescu C., Ztschr. Innere Med., Leipzig, **25**, 189 (1970).
21. Rădulescu C., Păuşescu E., European Surg. Res., Basel, **2**, 188, (1970).
22. Richardson-Mayes B., Graff R. J., Pareira D. M., Transplantation, **5**, 80 (1967).
23. Strominger J. L., Kalkar A. M., Axelrod J., Maxwell E. S., J. Biol. Chem. **224**, **79** (1957).
24. Unanue E. R., Nature, Londra, **218**, 36 (1968).
25. Valentine W. N., Beck W. S., J. Lab. Clin. Med., **38**, 39 (1951).
26. Wilson H. E., Johnson H. M., Dodd M. C., Transplantation, **6**, 374 (1968).
27. Young J. E., Prager M. D., J. Lab. Clin. Med., **60**, 385 (1962).

THE OXIDATIVE METABOLISM OF THE PERIPHERAL LEUCOCITES AND THE REJECTION OF KIDNEY ALLOGRAFTS

SUMMARY

Investigations were carried out periodically in dogs with kidney allograft, concerning some parameters of oxidative metabolism in the peripheral leucocites, as follows : a) oxidation of isocitrate, α-oxoglutarate, glutamate and succinate, b) effect of 2′,4′-dinitrophenol on the oxidation of these substrates ; c) activity of lactic dehydrogenase, succinic dehydrogenase, acid and alkaline phosphatases and uridine diphosphoglucose dehydrogenase. Significant changes (showing a depression or, on the contrary, a stimulation) were observed in most of these parameters. Possible relationships between these metabolic changes in the peripheral leucocites and the rejection of kidney allograft are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 417 – 422 (1970)

BIOCHIMIA COMPARATĂ A IZOENZIMELOR

X. PROTEINELE SOLUBILE DIN CREIER ÎN FILOGENIE ŞI LOCALIZAREA IZOENZIMELOR LACTAT DEHIDROGENAZEI, ALDOLAZEI, MALAT DEHIDROGENAZEI ŞI ASPARTAT AMINOTRANSFERAZEI [1]

MIHAIL ŞERBAN şi DITA COTARIU

Rezumat. — Se descriu o serie de caracteristici ale proteinelor cerebrale solubile provenite de la diferite specii aparţinînd tuturor claselor de vertebrate. Aceste caracteristici se referă la gradul de eterogenitate, la mobilitatea electroforetică şi la raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de proteine. Se prezintă localizarea în spectrul electroforetic a izoenzimelor lactat dehidrogenazei, aldolazei, malat dehidrogenazei şi aspartat aminotransferazei şi se discută comparativ analogiile cu aceleaşi izoenzime din ţesutul muscular al diferitelor vertebrate.

În lucrări anterioare au fost descrise şi caracterizate formele moleculare ale unor enzime cerebrale integrate în diferite catene metabolice, ca de exemplu lactat dehidrogenaza (LDH), aldolaza (A), malat dehidrogenaza (MDH) şi aspartat aminotransferaza (AAT), în seria vertebratelor [1] — [5]. Cercetările efectuate au ilustrat o serie de particularităţi ale acestor izoenzime, şi anume polimorfismul, mobilitatea electroforetică, repartiţia activităţii enzimatice, originea lor etc. Analiza tuturor acestor date a permis stabilirea anumitor corelaţii între evoluţia moleculară a izoenzimelor menţionate şi evoluţia creierului, în cursul filogeniei vertebratelor.

Tot într-o lucrare anterioară [6] a fost descrisă şi eterogenitatea proteinelor musculare sarcoplasmatice, în seria vertebratelor, precum şi distribuţia izoenzimelor LDH, A, MDH şi AAT în spectrele electroforetice ale acestor proteine, la diferite specii.

Ca o continuare a acestor cercetări, în lucrarea de faţă se studiază comparativ gradul de eterogenitate al proteinelor solubile din creier, în cursul evoluţiei filogenetice a vertebratelor, precum şi localizarea izoenzimelor LDH, A, MDH şi AAT; de asemenea, se prezintă comparativ corelaţiile cu caracteristicile proteinelor sarcoplasmatice, respectiv cu localizarea izoenzimelor musculare în cadrul aceloraşi specii.

---

[1] Asistenţa tehnică A. Radu.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe extracte proteice de creier provenind de la 11 specii, reprezentînd toate cele 5 clase de vertebrate şi, în limita posibilităţilor, în cadrul aceleiaşi clase, ordine sau familii diferite : peşti (*Cyprinus, carpio. Carassius*), amfibii (*Triturus, Rana ridibunda*), reptile (*Emys orbicularis, Natrix natrix*), păsări (*Columba domestica, Gallus domestica*), mamifere, (şobolan, iepure, bou). Imediat după prelevare, creierul a fost spălat de cîteva ori cu soluţie fiziologică rece, tamponat cu hîrtie de filtru şi cîntărit. S-a lucrat pe probe de creier provenind de la mai multe animale, după caz.

Extracţia proteinelor solubile s-a efectuat în soluţie tampom TRIS-HCl pH 7,6, timp de 3 ore, la +4°C. Pentru obţinerea formelor citoplasmatică şi mitocondrială a izoenzimelor MDH şi AAT, omogenatele obţinute au fost congelate şi decongelate în zăpadă carbonică, în trei reprize ; ulterior, omogenatele au fost centrifugate la 5 000 × g (+ 4°C), timp de 20 min, iar supernatantele respective au fost recentrifugate la 22 000 × g (+ 4°C), timp de 40 min. Concentraţia soluţiilor proteice a variat între 1,2—1,5 g/100 ml, în funcţie de provenienţa ţesutului cerebral.

Fracţionarea proteinelor cerebrale s-a realizat prin electroforeză în gel de amidon (13,8%), în tampon discontinuu [7]. În condiţiile noastre experimentale, migrarea electroforetică s-a efectuat timp de 150 min la + 10°C, aplicîndu-se o tensiune de 10 V/cm şi o intensitate de 2,6 mA/cm. Cantitatea de proteină supusă analizei a fost de 400 γ. Deoarece proteinele cerebrale solubile se obţin într-o concentraţie scăzută, soluţiile proteice respective au fost în prealabil concentrate pe Carbowax, timp de 30 min la + 6°C, în raportul 3/1. Fracţiunile proteice au fost revelate cu o soluţie de amidoblack B, după secţionarea prealabilă a gelului.

Evidenţierea izoenzimelor LDH, A, MDH şi AAT s-a realizat pe gelul de amidon selecţionat după procedeele şi tehnicile utilizate în lucrări anterioare [2] — [5].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Diagrama fracţionării electroforetice a proteinelor cerebrale, precum şi localizarea izoenzimelor LDH, A, MDH şi AAT la diferite specii de vertebrate sînt reprezentate în figura 1.

La nivelul proteinelor cerebrale se pun în evidenţă o serie de particularităţi care interesează eterogenitatea, mobilitatea în cîmp electric şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri componente. Astfel, se constată că pe măsura evoluţiei, gradul de eterogenitate al proteinelor cerebrale solubile creşte. Diferenţa între numărul fracţiunilor proteice la cele două clase de vertebrate extreme — peşti şi mamifere — apare evident. Astfel, la peşti, spectrul electroforetic proteic se compune din aproximativ 15 fracţiuni, pe cînd la mamifere numărul acestora ajunge pînă la 24—25. Celelalte specii, aparţinînd amfibiilor, reptilelor şi păsărilor, ocupă poziţii intermediare între aceste două extreme, deşi pot exista şi în acest caz anumite variaţii. Această complexare a microeterogenităţii proteinelor cere-

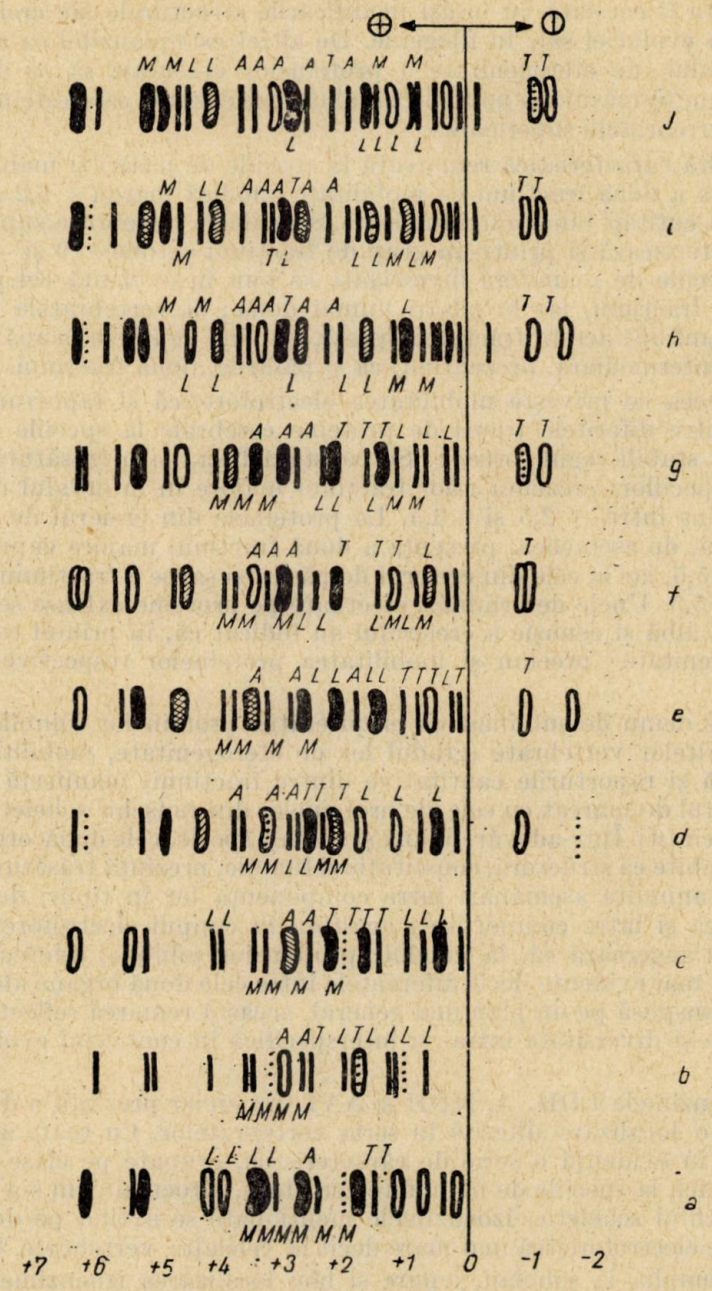


Fig. 1. — Diagrama electroforetică a proteinelor cerebrale solubile şi localizarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei (L), aldolazei (A), malat dehidrogenazei (M) şi aspartat aminotransferazei (T). *a* — peşte (crap, caras); *b* — triton; *c* — broască; *d* — broască ţestoasă; *e* — şarpe; *f* — găină; *g* porumbel; *h* — şobolan; *i* — iepure; *j* — bou.

brale poate fi corelată cu însăşi modificările structurale ale creierului, ca expresie a evoluţiei sale în filogenie. De altfel, este plauzibil ca diferenţierea gradului de eterogenitate a proteinelor cerebrale să se datorească într-o anumită măsură şi polimorfismului unor enzime, care este mai accentuat la vertebratele superioare.

O altă caracteristică remarcată la speciile de păsări şi mamifere este şi prezenţa a două fracţiuni cu mobilitate anodică mare (+ 6,2 şi + 6,5), ce apar ca entităţi bine individualizate. Speciile de vertebrate superioare se mai caracterizează şi printr-un grup de fracţiuni catodice (0 şi — 2). Astfel, la speciile de mamifere investigate se pun în evidenţă cel puţin trei asemenea fracţiuni, iar la păsări numai două; la vertebratele inferioare (peşti şi amfibii) aceste fracţiuni lipsesc, pe cînd reptilele ocupă o poziţie oarecum intermediară, prezentînd, ca şi păsările, două fracţiuni.

În ceea ce priveşte mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de proteine cerebrale la speciile cercetate, nu se pot stabili reguli precise. Se constată însă, ca o trăsătură comună tuturor speciilor prezenţa unor fracţiuni majore în intervalul de mobilitate cuprins între + 2,5 şi + 3,5. La proteinele din creierul de mamifere se remarcă, de asemenea, prezenţa a două fracţiuni majore cuprinse între + 5 şi + 5,5, iar la cele din creierul de păsări şi şarpe a fracţiunii cu mobilitatea + 5,5. Unele determinări efectuate pe proteine extrase separat din substanţa albă şi cenuşie a creierului au indicat că, în primul caz, gradul de eterogenitate precum şi mobilitatea proteinelor respective sînt mai mici.

Este demn de subliniat că proprietăţile proteinelor solubile din creierul diferitelor vertebrate (gradul lor de eterogenitate, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre fracţiuni) manifestă un paralelism destul de marcat cu cele ale proteinelor din muşchii scheletici ai aceloraşi specii [6]. Într-adevăr, la una şi aceeaşi specie, cele două organe, profund deosebite ca structură, constituţie şi funcţie, prezintă trăsături comune respectiv anumite asemănări între componenţa lor în tipuri de proteine solubile, ca şi între comportarea acestora în cîmpul electroforetic. Acest paralelism sugerează că, la nivelul proteinelor solubile, diferenţele între specii sînt mai evidente decît diferenţele între cele două organe ale aceleiaşi specii. Transpusă pe un plan mai general, această remarcă reflectă relaţiile de unitate şi diversitate intra- şi interspecifică în contextul evoluţiei biochimice.

Izoenzimele LDH, A, MDH şi AAT din creier prezintă o distribuţie, respectiv o localizare diferită în seria vertebratelor. Cu toate acestea, se pot pune în evidenţă o serie de caracteristici, grupate pe clase de vertebrate. Astfel, la speciile de mamifere cercetate, întocmai cum s-a constatat şi la muşchiul scheletic, izoenzimele menţionate se extind pe domenii de mobilitate electroforetică mai mare decît la celelalte vertebrate. Se remarcă, de exemplu, la şobolan, iepure şi bou localizarea izoenzimelor LDH_1 (în special) şi LDH_2, precum şi a conformerilor formei citoplasmatice a MDH în regiunea de mobilitate cuprinsă între + 4,2 şi 5,5. Dimpotrivă, la păsări şi reptile cele două tipuri de izoenzime LDH sînt localizate în domeniul + 2,2 şi + 3,0. Spre deosebire de vertebratele superioare , speciile de reptile, amfibii şi peşti prezintă o localizare mai compactă a izo-

enzimelor MDH citoplasmatice, în regiunea cuprinsă între + 2,2 şi + 4,0. La păsări şi mamifere, izoenzimele MDH mai prezintă un grup cu mobilitate mai mică (+ 0,5 şi + 1,3), grup care, după cum am arătat anterior (4), aparţine formei MDH de tip mitocondrial.

Cu excepţia mamiferelor, izoenzimele AAT citoplasmatice sînt localizate în general, într-un domeniu de mobilitate electroforetică mai mică (+ 0,5 şi 2,6); se remarcă, în special, localizarea AAT din creierul de şarpe, care manifestă cea mai mică mobilitate anodică (0 şi + 1). O activitate AAT se pune în evidenţă şi în regiunea catodică (— 1 şi — 2), însă numai la speciile de mamifere, păsări şi reptile. Izoenzimele AAT cu mobilitate catodică, aparţinînd formei mitocondriale, nu au fost puse în evidenţă la vertebratele inferioare (peşti şi amfibii) [4].

Ca şi în cazul proteinelor, se poate stabili un paralelism între localizarea izoenzimelor LDH, MDH şi AAT la creier şi la muşchi, în cadrul aceleiaşi specii. Într-adevăr, repartiţia acestor izoenzime prezintă o serie de trăsături comune la ambele organe. O excepţie o constituie însă izoenzimele aldolazei din creier [3], care manifestă un polimorfism variabil, ce creşte de la peşti la mamifere; aceste izoenzime sînt localizate în domeniul de mobilitate cuprins între + 2,2 şi + 3,8. În ţesutul muscular însă izoenzimele aldolazei prezintă o localizare identică la toate speciile de vertebrate investigate; în comparaţie cu izoenzimele aldolazei din creier, cele musculare posedă, la toate vertebratele studiate, o mobilitate extrem de scăzută (0 şi + 1), fără o individualizare marcată.

CONCLUZII

— Proteinele cerebrale solubile prezintă în seria vertebratelor grade de eterogenitate variabile; se remarcă tendinţa de creştere a eterogenităţii proteinelor solubile pe măsura evoluţiei biologice a speciilor. La vertebratele superioare, spectrul electroforetic al acestor proteine prezintă o serie de particularităţi distinctive.

— La una şi aceeaşi specie s-au evidenţiat o serie de trăsături comune între proteinele cerebrale şi cele musculare.

— Izoenzimele lactat dehidrogenazei, aldolazei, malat dehidrogenazei şi aspartat aminotransferazei din creier sînt localizate în mod diferit în spectrul electroforetic, prezentînd anumite particularităţi în funcţie de poziţiile taxonomice ale speciilor cercetate.

— Există un paralelism între repartiţia şi comportarea acestor izoenzime atît la creier, cît şi la muşchi, în cadrul aceleiaşi specii. Fac excepţie de la această regulă izoenzimele aldolazei, al căror polimorfism şi localizare sînt diferite la creier şi muşchi.

Prezentat la redacţie la 6 iunie 1970

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Şerban , St. cerc. biochim., **10**, 287 (1967).
2. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **4**, 325 (1967).
3. D. Cotariu, M. Şerban, Rev. roum. Biochim., **6**, 11 (1969).
4. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **7**, 157 (1970).
5. M. Şerban, Margareta Şerban, Rev. roum. Biochim, **7**, 231, (1970).
6. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biol., seria Zool., sub tipar.
7. M. D. Poulik, Nature, Lond., **180**, 1477 (1957).

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY OF ISOENZYMES

X. BRAIN SOLUBLE PROTEINS IN PHYLOGENY AND THE LOCALIZATION OF LACTATE DEHYDROGENASE, ALDOLASE, MALATE DEHYDROGENASE AND ASPARTATE AMINOTRANSFERASE ISOENZYMES

SUMMARY

Some peculiarities of brain soluble proteins originating in different vertebrate species are described, viz., the degree of heterogeneity, the electrophoretic mobility and the quantitative ratios between different protein types. The localization within electrophoretic patterns of lactate dehydrogenase, aldolase, malate dehydrogenase and aspartate aminotransferase was illustrated and the analogies with some muscle enzymes from different vertebrates were comparatively discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 423 – 429 (1970)

EFECTUL POLENULUI DE PORUMB DIN HRANA GĂINILOR ASUPRA PIGMENTAȚIEI GĂLBENUȘULUI DE OU

V. TĂMAȘ, GH. SĂLĂJAN și C. BODEA

Rezumat. – Adaosul de polen de porumb în hrana găinilor determină o pigmentare mai intensă a gălbenușului de ou și o creștere a valorii lui provitaminice.

În ultimul timp se acordă o importanță sporită pigmentației produselor alimentare, în primul rînd a celor de proveniență animală [1], [2]. Multor produse alimentare li se adaugă pigmenți, pe de o parte în scopul de a le imprima un aspect mai plăcut, iar pe de altă parte pentru a le îmbunătăți valoarea biologică, Așa, de exemplu, margarina, laptele praf, pastele făinoase, diferite preparate culinare primesc adaosuri de pigmenți carotinoidici, care au putere mare de pigmentare, cît și rol de provitamine A.

În contextul acestei probleme, un loc însemnat revine cercetărilor privind pigmentația gălbenușului oului de găină. Se știe că în gălbenuș se acumulează o mare parte a carotinoidelor din hrana consumată [3]. În literatura de specialitate există numeroase date cu privire la influența diferiților factori alimentari asupra pigmentației [4]. S-a cercetat efectul diferitelor surse alimentare, ca : făina de carne [5], ardeii [6], algele [7], făina de cereale [7], [8] și altele. Cercetările confirmă că acumularea carotinoidelor în gălbenușul de ou este strîns legată de conținutul lor în hrană [3]. Unele dintre carotinoide, cum sînt hidroxi-carotinoidele luteină și zeaxantină, se acumulează în gălbenuș fără nici o modificare, iar altele sînt convertite în vitamină A [9].

În scopul cunoașterii efectului polenului asupra pigmentației ouălor, ne-am propus să urmărim gradul de acumulare a carotinoidelor în gălbenușul ouălor de găină, în funcție de alimentația cu și fără adaos de polen de porumb.

MATERIAL ȘI METODE

Loturile experimentale și alimentația lor

Cercetările s-au efectuat pe găini din rasa Leghorn (hibridul *Starcross*), crescute în condiții strict experimentale, de la vîrsta de pui de o zi, în padocuri închise, în condiții microclimatice identice. S-au alcătuit

6 loturi de cîte 30 capete. În perioada de creștere, lotul 1, considerat martor, a fost alimentat cu un furaj de bază (amestec de concentrate), a cărui structură a fost adaptată vîrstei. Loturilor 2, 3, 4, și 5 li s-a dat aceeași hrană, dar cu un adaos de polen de porumb în proporție de 1, 2, 3 și respectiv 4% din furaj. În furajul lotului 6, proteina de origine animală s-a substituit în proporție de 50% cu proteină din polen (ceea ce reprezintă aproximativ 9% polen în furaj).

O dată cu începerea ouatului, structura furajului de bază s-a adaptat producției de ouă (tabela 1). În această perioadă, loturilor 1 și 6 li

Tabela 1

Structura și compoziția chimică brută a furajului de bază în perioada ouatului

	Component	%
Structură	Uruială de porumb	57,00
	Șroturi floarea-soarelui	17,00
	Uruială de orz	6,00
	Tărîțe de grîu	8,00
	Făină de carne	2,00
	Lapte praf	1,00
	Drojdie de bere	1,00
	Făină de pește	0,50
	Cretă furajeră	5,00
	Fosfomar	1,47
	Sare de bucătărie (NaCl)	0,50
	Avîmin	0,03
Compoziție chimică	Substanță uscată	87,10
	Proteină brută	17,79
	Grăsime brută	2,28
	Celuloză brută	5,11
	Substanțe extractive fără azot	51,00
	Cenușă	10,92

s-a administrat numai furajul de bază, în timp ce la loturile 2, 3, 4 și 5 s-au alternat două regimuri de furaje : după o perioadă inițială de 2 luni cu furaj de bază, fără adaos de polen, a urmat o altă perioadă de 2 luni, în care furajului de bază i s-a adăugat polen în proporțiile arătate, alternîndu-se apoi aceste regimuri.

Determinarea carotinoidelor din furaje și ouă

Determinarea conținutului de carotinoide în gălbenușul de ou s-a efectuat la 12 august 1969, la sfîrșitul unei perioade de alimentație cu furaj ce conținea polen de porumb (12 iunie — 12 august), găinile avînd vîrsta de 16 luni.

1. *Extracție.* Pentru extragerea pigmenților carotinoidici s-au utilizat procedee cunoscute [9] — [11], cu unele modificări, atît în cazul furajelor cît și al ouălor.

— *Extracția din furaj și polen.* La 100 g material (furaj măcinat) s-au adăugat 150 cm^3 KOH 8% etanolic și s-a încălzit, pe baie de apă,

la 50°C, timp de 40 minute. După răcire, s-au adăugat 100 cm³ eter de petrol şi apoi încă 200 cm³ amestec de eter de petrol-benzen (în raportul 5 : 1).

— *Extracţia din gălbenuşul de ou.* Pentru determinarea carotinoidelor s-au utilizat 8 gălbenuşuri de ou. Conţinutul gălbenuşului, bine separat de albuş şi cîntărit, s-a tratat într-un pahar cu 75 cm³ acetonă şi s-a amestecat bine cu o baghetă. Pigmenţii s-au extras apoi cu un amestec de solvenţi format din 850 cm³ eter de petrol şi 50 cm³ etanol, în porţiuni de cîte 100 cm³, pînă la decolorare. Extractul a fost apoi saponificat ca şi în cazul furajului şi al polenului.

2. *Separare.* Extractele obţinute au fost spălate de 5—6 ori cu soluţie saturată de NaCl şi apoi de 15—20 ori cu apă. Soluţia pigmenţilor s-a uscat pe Na_2SO_4 şi apoi s-a cromatografiat pe un amestec adsorbant format din oxid de magneziu şi sticlă pisată (1 : 4 în greutate). Cromatograma a fost developată cu un amestec de eter de petrol ce conţinea 2% benzen. După caz, pigmenţii au fost recromatografiaţi. Din cromatogramă, pigmenţii au fost separaţi şi apoi eluaţi cu amestec de eter de petrol -5% etanol. Soluţia fiecărui pigment s-a adus la un anumit volum.

3. *Identificare şi dozare.* Identificarea carotinoidelor s-a făcut după maximele lor de absorbţie în regiunea vizibilă, prin cromatograme cu pigmenţi autentici, şi după repartiţia lor hipofazică şi epifazică în eter de petrol-metanol 95%. La carotinoidele 5,6- şi 5,8-epoxidice s-a efectuat şi reacţia de culoare cu HCl în eter etilic. Pentru 5,8-epoxi-zeaxantină, s-a efectuat reacţia de transformare în anhidroeşşolţxantină, sub acţiunea $TiCl_4$ [12].

Dozarea pigmenţilor s-a făcut prin metoda spectrofotometrică, utilizînd un spectrofotometru Universal, tip VSU-1 *Zeiss*. Calculul conţinutului s-a făcut după următoarea relaţie [13], [14]:

$$x \text{ (în grame)} = \frac{E \cdot Y}{E^{1\%}_{1cm}},$$

în care: E reprezintă extincţia molară (pentru λ_{max}), Y volumul soluţiei (în cm³), $E^{1\%}_{1cm}$ extincţia specifică.

Valorile extincţiei specifice utilizate în calcul sînt: β-carotină, $E^{1\%}_{1cm} = 2505$ (la 451 nm, în hexan), criptoxantină, $E^{1\%}_{1cm} = 2460$ (la 451 nm, în hexan), luteină, $E^{1\%}_{1cm} = 2550$ (la 447 nm, în etanol), zeaxantină, $E^{1\%}_{1cm} = 2350$ (la 451 nm, în etalon).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele analizelor sînt prezentate în tabela 2.

Din datele prezentate în tabela 2 reiese că pigmenţii carotinoidici proveniţi din hrană se acumulează în mare măsură în gălbenuş. Această acumulare este în funcţie de conţinutul carotinoidelor în hrană. Întrucît polenul este o sursă bogată de carotinoide, îndeosebi de luteină şi zeaxantină, aportul său la conţinutul total de carotinoide din gălbenuş este

Tabela 2

Conținutul în carotinoide al polenului, furajelor și gălbenușurilor (în mg la kg material)

Material / Carotinoidă	Polen	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Lot 4		L 5		Lot 6	
		F	G	F	G	F	G	F	G	F	G	F	G
5,8-Epoxizeaxantină	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u
5,6-Epoxiluteină	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u
Zeaxantină	16,20	10,90	10,86	10,95	26,05	11,00	20,93	11,06	20,90	11,11	51,05	10,90	14,23
Luteină	36,00	13,80	15,40	14,02	30,77	14,24	26,50	14,45	30,20	14,65	30,20	13,80	11,62
Criptoxantină	0,78	1,00	—	1,00	u	1,00	u	0,99	0,50	0,99	1,60	1,00	1,59
β-Carotină	3,98	2,46	1,66	2,83	4,66	3,19	4,20	3,55	2,60	3,90	2,63	2,46	1,69
α-Carotină	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u
Total	38,96	28,16	27,92	28,20	61,48	29,43	51,63	30,05	54,20	30,65	65,48	28,16	29,13

F = furaj; G = gălbenuș (crud); u = urme (sub 0,10 mg la kg).

în funcţie de cantitatea adăugată în hrană. Astfel, ouăle provenite de la găinile loturilor 2, 3, 4 şi 5 conţin, în gălbenuş, cantităţi mărite de carotinoide, cuprinse între 51,63 şi 65,48 mg/kg gălbenuş, în comparaţie cu numai 27,92 mg/kg în cazul celor provenite de la lotul martor.

Pentru a putea aprecia valoarea carotinoidelor în pigmentarea gălbenuşului şi ca provitamine A este necesară cunoaşterea naturii diferitelor carotinoide acumulate în gălbenuş. Ca provitamine funcţionează β-carotina şi criptoxantina, iar la intensitatea pigmentaţiei contribuie, în primul rînd, β-carotina, criptoxantina şi zeaxantina. În tabela 3 este prezentată o grupare din acest punct de vedere a carotinoidelor din gălbenuşurile analizate pe loturi.

Tabela 3

Conţinutul gălbenuşurilor în carotinoide cu (A) şi fără rol provitaminic (B) şi cu rol deosebit în pigmentare (C) (în mg/kg)

Grupa de carotinoide	Lotul					
	1	2	3	4	5	6
A	1,66	4,66	4,20	3,10	4,23	3,28
B	26,26	56,82	57,43	51,10	61,25	25,85
C	12,52	30,71	25,13	24,00	35,48	17,50

A = β — carotină şi criptoxantină ; B = zeaxantină şi luteină ; C = β-carotină, criptoxantină şi zeaxantină.

Din datele prezentate în tabela 3 reise că are loc o acumulare a tuturor tipurilor de carotinoide. O acumulare accentuată se constată la carotinoidele fără rol de provitamină [13], întrucît acestea nu suferă transformări decît în mică măsură. Conţinutul în carotinoide cu rol de provitamină (A) creşte faţă de martor, dar variază numai între 3,10—4,66 mg/kg, deşi sursa alimentară furnizează cantităţi crescînde din aceste carotinoide. Valorile conţinutului relativ mic în aceste carotinoide se datoresc faptului că o parte din ele sînt transformate în alţi produşi, printre care şi vitamina A.

În ceea ce priveşte acumularea carotinoidelor cu rol deosebit în pigmentaţia gălbenuşului (C), valorile acestora sînt cuprinse între 24,00 şi 35,48 mg/kg, faţă de 12,52 mg/kg la lotul martor. Din acest motiv, gălbenuşurile ouălor provenite de la găinile care au primit hrană cu polen au o culoare mai portocalie decît cele de la lotul martor. Dar pigmentaţia gălbenuşului este în funcţie nu numai de conţinutul său total în carotinoide, ci şi de natura carotinoidelor. Acest fapt este ilustrat de raportul între carotinoidelor A/B/C, în comparaţie cu raportul acestor carotinoide în furaje (tabela 4).

Deoarece principalele carotinoide acumulate în gălbenuşul de ou sînt zeaxantina (portocalie), luteina (galbenă) şi β-carotina (portocalie), culoarea gălbenuşului de ou depinde de cantităţile absolute şi proporţiile în care se găsesc aceste carotinoide. Prin faptul că în gălbenuş predomină zeaxantina şi luteina (vezi tabela 3), culoarea gălbenuşului depinde în primul rînd de raportul acestor două carotinoide (tabela 5).

Tabela 4

Raportul dintre diferitele grupe de carotinoide A, B și C în furaje și în gălbenușul de ou
(raportul A/B/C luînd A = 1; vezi și tabela 3)

Lotul	Furaj	Gălbenuș de ou
1	1/7,14/4,15	1/15,82/7,54
2	1/6,52/3,86	1/12,19/6,59
3	1/6,02/3,63	1/13,67/5,98
4	1/5,62/3,44	1/16,48/7,74
5	1/5,27/3,27	1/14,48/8,39
6	1/7,14/4,15	1/7,88/5,34

Tabela 5

Raportul zeaxantină/luteină (Z/L) în gălbenușul de ou

Lotul	1	2	3	4	5	6
Z/L	0,70	0,84	0,79	0,69	1,02	1,22

De aici rezultă că gălbenușurile ouălor din loturile 2, 3 și 4 au o culoare mai galbenă, întrucît raportul Z/L este subunitar, iar cele din loturile 5 și 6 au o culoare portocalie, determinată de valoarea supraunitară a raportului Z/L. Trebuie însă menționat faptul că ouăle din lotul 6, care nu a primit polen în perioada ouatului, prezintă un conținut mai mare în zeaxantină decît în luteină (probabil un efect de remanență mai mare al zeaxantinei) și, deci, culoarea gălbenușului este mai portocalie decît la lotul martor, dar întrucît conținutul total în carotinoide este mai mic decît la loturile 2, 3, 4 și 5, valoarea biologică este mai redusă.

CONCLUZII

1. Polenul de porumb constituie o bună sursă de carotinoide pentru găinile ouătoare.
2. Carotinoidele din polenul de porumb contribuie la pigmentarea corespunzătoare a gălbenușului și la mărirea valorii lui biologice.
3. Rezultatele cele mai bune, atît în pigmentarea gălbenușului cît și în acumularea carotinoidelor cu acțiune provitaminică, s-au obținut cu un adaos de 4% polen de porumb în hrană, fapt pentru care se recomandă aplicarea în producție a acestui regim alimentar.

Prezentat la redacție la 14 februarie 1970

Institutul Agronomic „Dr. Petru Groza", Catedra de chimie și catedra de alimentația animalelor domestice, str. Mănăștur, nr. 3, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. O. Isler. A. Ofner şi G. F. Siemers, Food Technol., **12**, 520 (1958).
2. C. D. Usher şi D. J. Favell, Analyst, **93**, 107 (1968).
3. G. Madiedo şi M. L. Sunde, Poultry Sci., **43**, 1056 (1964).
4. F. M. Farr, B. J. Hullet, R. E. Devies şi J. R. Couch, Poultry Sci., **40**, 1401 (1961).
5. J. R. Kingan şi T. W. Sullivan, Poultry Sci., **43** 1025 (1964).
6. E. Mackay, G. J. Mountney şi E. C. Naber. Poultry Sci., **42**, 32 (1963).
7. G. Madiedo, E. F. Richter şi M. L. Sunde Poultry, Sci., **43**, 990 (1964).
8. T. W. Sullivan şi K. A. Holleman, Poultry Sci., **41**, 1474 (1962).
9. M. L. Scott, I. Ascarelli şi G. Olson, Poultry Sci., **47**, 863 (1968).
10. * * * *Association of Official Agricultural Chemists, Official Methods of Analysis*, Washington, D. C., 1960.
11. J. L. Faisson şi N. Arpin, Bull. Soc. Chim. Biol., **49**, 535 (1967).
12. V. Tămaş şi C. Bodea, Rev. roum. chim. **15**, 655 (1970).
13. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London-New York, 1965, p. 529.
14. F. C. Czygan, Arch. Mikrobiol., **61**, 81 (1968).

EFFECT OF CORN POLLEN IN HEN FOOD ON PIGMENTATION OF EGG YOLK

SUMMARY

The addition of corn pollen to food of hens induces an intensification of yolk pigmentation and an increase in its provitamin value.

ST. CERC. BIOCHIM., 13, 4, 431–436 (1970)

RECENZII

HOMOLOGOUS ENZYMES AND BIOCHEMICAL EVOLUTION. A colloquium organized under the Auspices of the Advanced Study Group of NATO (Enzime omologe şi evoluţia biochimică. Colocviu organizat sub auspiciile grupei de studii avansate a NATO). Ediţie îngrijită de NGUYEN VAN THOAI şi JEAN ROCHE, Gordon and Breach, Science Publishers, New York, London, Paris, 1968, 436 p.

Cartea care o prezentăm cuprinde materialele Colocviului organizat sub auspiciile NATO şi ale Catedrei de biochimie generală şi comparată de la Collège de France din Paris. Colocviul, la care au participat 44 de specialişti, a fost dedicat discutării mecanismului biochimic al evoluţiei biologice, prin prisma studiului enzimelor omologe.

Materialele prezentate au fost grupate în cinci părţi, cu o introducere care tratează despre aspectele structurale şi genetice ale evoluţiei proteinelor (Charles J. Epstein, U.S.A.) şi o încheiere care înglobează concluziile asupra conceptului şi semnificaţiei evoluţiei enzimelor (N. O. Kaplan, U.S.A.).

În partea I-a sînt prezentate două referate de ansamblu, unul despre „Formele multiple ale enzimelor" (Th. Wieland, R.F.G.), iar altul despre „Conceptul de izoenzimă" (R. J. Wieme, Belgia).

Partea a II-a cuprinde şapte comunicări din domeniul oxido-reductazelor, care tratează: aspecte ale evoluţiei proteinelor, omologia oxidazelor, lactatdehidrogenazele din *S. cerevisiae*, distribuţia catenelor de aminoacizi în dehidrogenaze, chimia şi biochimia comparată a dehidrogenazelor, evoluţia enzimelor specifice de loc, evoluţia ontogenetică şi modificările patologice ale formelor multiple ale lactatdehidrogenazei, creatinkinazei şi aldolazei.

Partea a III-a înmănunchiază şase comunicări privind: aspecte comparative ale mecanismului structurii şi funcţiunii fosfoglicerat mutazelor, fosfagenfosfokinazele omologe, aspecte comparative ale formelor multiple ale creatinkinazei, biochimia comparată a creatinfosfotransferazelor la animale şi originea şi evoluţia fosfagenfosfotransferazelor.

Partea a IV-a cuprinde cinci comunicări care tratează despre evoluţia esterazelor la vertebrate, activitatea DN-azică în cursul diviziunii celulare, formele multiple ale fosfatazei alcaline, biochimia comparată a lizozimelor şi studiul prin metode de imunodifuzie al hidrolazelor pancreatice din diverse specii de animale.

Partea a V-a prezintă, în două comunicări, aspecte ale studiului enzimelor din catene metabolice ramificate — sinteza şi utilizarea carbamoilfosfatului sau enzimele multiple şi multifuncţionale din catena de biosinteză a lizinei, treoninei, metioninei şi izoleucinei.

Concluziile cu care se încheie acest colocviu subliniază rezultatele obţinute în cadrul celor trei mari grupe de enzime, care au arătat că la înţelegerea mecanismului biochimic de acţiune al proteinelor enzimatic active contribuie studierea lor în cursul procesului de evoluţie.

Prin publicarea materialelor expuse la acest colocviu se aduce o contribuţie deosebit de preţioasă la literatura de specialitate, deoarece ele atestă rolul major al cercetărilor de biochimie comparată în evidenţierea principiilor evoluţiei, transpuse la nivel molecular.

Corina Iordache
Institutul de Biochimie,
Bucureşti

JOHN M. REINER, *Behavior of enzime systems* (Comportarea sistemelor enzimatice) Van Nostrand Reinhold Comp., N. York, Toronto, London, Melbourne, 1969, 345 pag.

Aflată la a 2-a ediție, cartea se reafirmă ca una din puținele din literatură privitoare la cinetica enzimatică și, poate, singura care tratează teoria matematică a cineticii, pentru enzimologi.

Primele două capitole aduc bagajul matematic minim necesar însușirii cineticii enzimatice, respectiv fac o introducere în studiul cineticii, prezentînd noțiunile fundamentale privitoare la proprietățile enzimelor.

Într-un scurt capitol următor sînt expuse reacțiile reversibile. După descrierea unui model simplu de reversibilitate, care este apoi folosit pentru fixarea noțiunilor principale legate de acest fenomen, se descrie un sistem reversibil „mai real", capitolul încheindu-se cu o comparare a noțiunii de echilibru enzimatic cu aceea de echilibru neenzimatic.

După studiul multilateral al efectului legării substratului (capitolul 4), completat cu graficele de diagnostic ale ratei ecuației efectului studiat, se trece la studiul sistemelor multienzimatice.

Legarea noțiunilor prezentate cu sistemele biologice complexe se face în capitolul următor, unde se analizează diferite aspecte ca: activitatea enzimatică, problema substratelor endogene, efectul de diluție, amestecul de substrate și de enzime cu efecte similare ș.a.

Reacțiile bimoleculare, sub toate aspectele, inhibiția prin produși finali, în condiții diferite, ca și problema coenzimelor, strîns legate, sînt discutate în capitolul al 7-lea.

Capitolul al 8-lea, cel mai dezvoltat, se ocupă pe larg de influența diferiților efectori asupra activității enzimatice, de enzimele polimere și de efectele de alosterie, de activatori și inhibitori ș.a. După tratarea reacțiilor activator-inhibitor, se trece la inhibiția endogenă, la substratele competitive și la rolul antimetaboliților. Capitolul se încheie cu prezentarea unor cazuri speciale: stimularea prin inhibitori, inhibitorul polimer și cuplurile activator-inhibitor.

Sistemelor de reacții cuplate le este consacrat capitolul al 9-lea. Partea cea mai importantă o constituie sistemele deschise și regimul staționar. Finalul capitolului prezintă bazele folosirii izotopilor în studiul metabolismului.

Penultimul capitol tratează efectele pH-ului și ale temperaturii asupra activității enzimatice.

Cartea se încheie cu descrierea structurii și stabilității proteinelor și a mecanismului acțiunii enzimelor, a fenomenului de denaturare și renaturare ș.a. În final, autorul propune modele ale unor mecanisme de diferite tipuri: statice, cvasistatice și dinamice. Ca supliment se discută unele probleme disparate ca: „De ce sînt enzimele proteine", „Secvențele implicate în activitate" și „Identitatea lui E".

Fiecare capitol tratază cîteva probleme ale căror soluții se găsesc într-un apendice special. De asemenea, fiecare capitol se încheie cu concluzii și cu o bibliografie, selectată pe lucrări generale și speciale. Cartea mai cuprinde un index de termeni.

Modul original al abordării materialelor conferă acestui volum atît calitățile unui manual de înalt nivel cît și ale unei monografii utile cercetătorilor profesioniști. Ea se adresează oamenilor de știință din toate ramurile biologiei și din cele legate de aceasta, în special biochimiștilor și microbiologilor. Deosebitelor calități pedagogice și științifice li se adaugă calități stilistice și grafice care ne îndreptățesc să recomandăm această carte cu căldură și simpatie, convinși că răspîndirea ei constituie un adevărat act de cultură științifică.

V. Eșanu
Institutul de Biologie „Tr. Săvulescu"
București

T.T. BERIOZOV, *Obmen aminokislot normalnîh i zlokacestvenîh opuholei* (Metabolismul aminoacizilor în țesuturile normale și în tumorile maligne), ed. Mediția, Moscova, 1969, 123 p.

În lucrarea de față, autorul realizează o sinteză și în același timp, o analiză a datelor din literatură și a rezulatelor personale privind metabolismul aminoacizilor în tumorile transplantate la animale, în tumorile primare la om și în procesele de geneză a cancerului.

După o analiză a principalelor căi de metabolizare a aminoacizilor în organismele animale (cap. I), autorul prezintă caracteristicile enzimatice ale tumorilor maligne (cap. II), din punct de vedere al principalelor categorii de enzime ce reglează metabolismul acizilor nucleici, glucidelor, lipidelor, proteinelor. În capitolul III sînt analizate enzimele metabolismului aminoacizilor în tumorile maligne, acordîndu-se o atenție deosebită amidazelor și enzimelor de dezaminare-transaminare și biosintezei unor compuși derivați de la acidul aspartic, acidul glutamic, alanină, fenilalanină.

Concluziile trase din analiza metabolismului aminoacizilor în tumorile maligne, comparativ cu țesutul normal, scot în evidență o pierdere în activitatea sau, ceea ce este mai probabil, o întîrziere a activității enzimelor catabolice specifice. În încheierea acestui capitol se discută, de asemenea, problema creerii de medicamente care să determine schimbări specifice în activitatea enzimelor din țesuturile tumorale.

Ideile principale din această lucrare și concluziile la care ajunge autorul sînt prezentate și într-un rezumat în limba engleză.

Prin analiza sintetică a materialului bibliografic deosebit de bogat (827 referiri bibliografice) din acest domeniu atît de important pentru medicină și biologie, precum și prin concluziile judicioase evidențiate de autor, lucrarea reprezintă un îndreptar deosebit de prețios pentru oncologi și biochimiști.

Olguța Macovschi
Institutul de Biochimie,
București

BASIC EXERCISES IN IMMUNOCHEMISTRY, A LABORATORY MANUAL (Exerciții de bază în imunochimie, un manual de laborator), A. NOWOTNY, Ed. Springer, Berlin-Heidelberg, New York, 1969, 197 p., 50 figuri.

Această carte este un clasic manual de laborator pentru studenți, care-i introduce în unele probleme ale imunochimiei produșilor naturali, anume : izolarea materialelor, analiza chimică a constituenților și structura lor, determinarea principalelor lor activități biologice și imunologice.

Manualul este împărțit în 68 de exerciții, fiecare avînd aceeași schemă : o *introducere* care dă principiul metodei, *materiale și aparate*, *procedeu* care dă, pe puncte, evoluția experienței evaluarea care dă căile de obținere a rezultatelor cantitative din experință, *întrebuințare și limitări* care dă o scurtă privire asupra aplicabilității metodei, posibilităților ei, scopurilor în care poate fi întrebuințată și asupra valorii reale a datelor obținute. La paragraful *referințe* sînt date cîteva dintre cele mai importante indicații bibliografice.

Exercițiile sînt însoțite de fotografii ale unor aparate și de scheme ale unor piese sau aparate, pentru a face mai ușoară înțelegerea întrebuințării lor.

Manualul se încheie cu o propunere de sistematizare a exercițiilor pentru personalul didactic din învățămîntul imunochimic cu o secvențializare mai „imună" a exercițiilor.

Ca manual de laborator pentru studenți, în domeniul unei științe atît de noi și fără tratate de bază cum este imunochimia, prezenta carte este deosebit de valoroasă. O recomandăm călduros chiar și laboratoarelor de cercetare mai puțin utilate, deoarece reușește să expună clar toate metodele de bază ale imunochimiei.

Cecilia Motaș
Institutul de Biochimie,
București

CURENT PROBLEMS IN IMMUNOLOGY (Probleme actuale în imunologie), Simpozionul I, Bayer, editat de O. Westphal, H. E. Bock și E. Grundmann, Ed. Springer, Berlin-Heidelberg, New York, 1969, 349 p., 135 figuri.

Volumul cuprinde lucrările primului simpozion Bayer, ținut în octombrie 1968, dedicat problemelor actuale ale imunologiei și axat în întregime pe așa-numitele boli imune. Au fost excluse cu totul problemele imunologiei tumorilor și ale rejecției transplantului. Sub denumirea de boli imune, organizatorii au înțeles toate acele boli în care sînt implicate mecanismele imunologice. Deoarece domeniul era și așa prea întins, el a fost restrîns la bolile imune ale sîngelui și la imunologia hepatitelor cronice, a glomerulonefritei, a unor boli tiroidiene și cardiovasculare și a reumatismului ; au fost incluse și alergiile la medicamente.

O condiție esențială pentru discuția acestor probleme clinice a fost cunoașterea proceselor imunologice ca atare, din punct de vedere teoretic. De aceea, lucrările simpozionului au fost împărțite în două părți : partea teoretică și partea clinică.

Partea teoretică cuprinde 17 referate și lucrări, fiecare cu discuțiile respective, dedicate structurii și formării anticorpurilor, semnificației purtătorului în inducerea anticorpilor, receptorilor eritrocitelor, transformărilor limfocitelor *in vitro*, a citotoxicității lor etc.

Numele cercetătorilor care au contribuit la această parte, ca F. Haurowitz, K. Rajewski, H. J. Müller-Eberhard etc., atestă importanța și seriozitatea simpozionului.

În *partea clinică* sînt prezentate rezultate experimentale discutate prin prisma mecanismelor producerii bolilor autoimune, și nu cazuri clinice. Toate rezultatele se discută în relație cu cunoștințele actuale teoretice, prezentate în prima parte.

Îmbinarea celor două grupe în cadrul aceluiași simpozion a fost o idee fericită, clinicienii avînd de învățat de la descoperirile de bază ale teoreticienilor, iar aceștia de la descoperirile clinicienilor.

Cecilia Motaș
Institutul de Biochimie,
București

HANDBUCH DER EXPRIMENTELLEN PHARMAKOLOGIE, Band XXII, DIE GESTAGENE, Teil 2 (Manual de farmacologie experimentală, volumul XXII, Gestagenele, partea a 2-a), editat de K. Junkmann, ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, 1334 p., 228 figuri.

Această a doua parte a volumului XXII consacrat gestagenelor cuprinde patru capitole (IX—XII).

Capitolul IX tratează la început particularitățile acțiunilor diferitelor gestagene asupra morfologiei și funcției tractului genital la om (Gh. Lauritzem și W. D. Lehmann) și la mamifere (F. Neumann, W. Elger, și R.R.Salloch). În continuare se prezintă influența gestagenelor asupra fecundării, nutriției și transportului ovulului, asupra evoluției sarcinii (W. Elger), asupra morfologiei și mobilității musculaturii uterului (R. R. Salloch), asupra funcției și morfologiei tractului genital la melci, gîndaci și vertebrate nemamifere (J. D. Han și F. Neumann), asupra morfologiei și funcției glandei mamare (H. Steinoeck) și asupra modului de comportament și a proceselor de diferențiere. Capitolul se încheie cu un studiu consacrat sintezei, acțiunii și degradării gestagenelor, bazat pe microscopia electronică (H. J. Merker).

Capitolul X cuprinde un studiu amplu asupra rolului fiziologic multilateral al progesteronei la om (H. — W. Boschmann) și în regnul vertebratelor (W. Jöchle).

Capitolul XI tratează rolul progesteronei în reglarea funcției ovariene inoretorii și generative (R. Buchholz).

Capitolul XII, ultimul, este consacrat aplicării gestagenelor în medicina veterinară și zootehnie (W. Jöchle) dintre care putem aminti, între altele, aplicarea lor în stări patologice, la creșterea animalelor domestice, la îngrășarea hormonală a acestora etc.

Materialele de nivel științific ridicat cuprinse în volum sînt însoțite de numeroase tabele, scheme și reproduceri remarcabile. Bibliografia extrem de bogată, dată la fiecare capitol în parte, un index alfabetic pe autori și subiecte fac acest volum și mai util cititorilor din diferitele specialități ale biologiei.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie,
București

HANDBUCH DER ALLGEMEINEN PATHOLOGIE, Band VI, ENTWICKLUNG, WACHSTUM, GESCHWULSTE, Teil 2, REGENERATION — HEYPERPLASIE — CANCERISIERUNG (Manual de patologie generală. Volumul VI, Evoluție, creștere, tumori, partea a II-a. Regenerare, hiperplazie, cancerizare), editat de F. Büchner, ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, 883 p., 314 fig.

Aplicarea sistematică a noilor metode moderne biochimice de investigare, elaborate mai ales în ultimul deceniu, a histoautoradiografiei, a cistofotometriei și a citologiei bazate pe folosirea microscopului electronic, a dus la o dezvoltare vertiginoasă a cercetărilor legate de biologia și patologia creșterii și a diferențierilor.

Rezultatele impresionante obținute în acest domeniu, în special cu privire la legitățile creșterii celulare, la regenerare și hiperplazie, precum și la relațiile dintre aceste procese

de creştere şi cancerizare, formează obiectul materialelor prezentate în acest volum de renumiţi specialişti cu contribuţii valoroase şi experienţă îndelungată în această ramură a ştiinţei.

Primul capitol, prezentat de R. Schindler (Berna), dă o privire de ansamblu asupra *biochimiei regenerării*. Sînt tratate în acest capitol probleme ca structura şi sinteza ADN şi perturbarea acestora prin factori chimici şi energie radiantă, sinteza ARN şi a proteinelor şi perturbarea ei, reglarea şi desfăşurarea proceselor biochimice în timpul proceselor de regenerare, ilustrată pe exemplul epiteliilor superficiale, al culturilor de celule şi al regenerării ficatului, şi, în sfîrşit, problema privitoare la factori biochimici declanşatori ai proliferării.

În cel de al doilea capitol se tratează *regenerarea reparativă a parenchimului pe exemplul ficatului în urma hepatectomiei parţiale*, de către E. Grudmann şi H. J. Seidel (Wuppertal-Elberfeld). La început autorii discută, pe baza preparatelor microscopice obţinute mai ales cu ajutorul microscopului electronic, aspecte legate de faza preproliferativă, proliferarea iniţială şi faza restituţiei, pentru a trece apoi la influenţarea regenerării prin factori exogeni şi endocrini. Capitolul se încheie cu examinarea problemei declanşării reglării regenerării.

În capitolul III, privitor la *regenerare, hiperplazie şi cancerizare pe exemplu ţesutului epitelial de schimb*, W. Oehlert (Freiburg I. Br.) se ocupă, mai ales pe baza analizelor autoradiografice şi microscopice efectuate cu microscopul electronic, de cinetica proliferării în timpul regenerării, hiperplaziei şi cancerizării la nivelul epiteliului multistratificat în plăci, al epiteliului traheobronhial, al mucoasei tractului gastro-intestinal şi al urotelului vezicii urinare.

Urmează un capitol consacrat *ortologiei şi patologiei regenerării măduvei osoase*, prezentat de T. M. Fliender şi W. Calvo (Ulm). După ce dau noţiuni generale cu privire la filogeneza, ortogeneza şi orotologia măduvei osoase, autorii trec la analiza regenerării fiziologice a măduvei osoase pentru celulele hematopoetice fundamentale, granulocite, eritrocite, megacariocite, monocite şi stroma măduvei osoase. Tratează apoi amănunţit regenerarea osoasă în urma unei iradieri totale sau parţiale a organismului cu energia radiantă şi în urma transfuziei cu celule de măduvă osoasă. În încheiere, se discută hiperplazia măduvei osoase şi relaţiile dintre neoplaziile măduvei osoase şi regenerare.

Ultimul capitol semnat de H. Cottier, M. W. Hess, B. Roos şi P.A. Grétillat (Berna) se referă la *regenerarea, hiperplazia şi oncogeneza organelor limforeticulare*. După o introducere privitoare la filogeneza, ontogeneza şi ortologia şi citologia sistemului limforeticular, autorii trec la tratarea regenerării fiziologice, a proceselor de diferenţiere la nivelul sistemului limforeticular, a regenerării patologice a sistemului după îndepărtarea sa mecanică, după acţiunea radiaţiilor ionizante, după administrare de ser antilimfocitar, de citostatice şi de alţi inhibitori, în diferite stări patologice etc. Capitolul se încheie cu discutarea ontogenezei sistemului limforeticular în cazul leucemiei virotice şi al neoplaziilor provocate de energie radiantă şi de factori chimici.

Materialele prezentate în acest volum care se adresează, în egală măsură, atît medicilor de diferite specialităţi cît şi biochimiştilor, biologilor, histochimiştilor şi farmacologilor, cuprind, pe lîngă numeroase tabele şi scheme sugestive, un mare număr de reproduceri deosebit de reuşite de secţiuni histologice. Un index alfabetic pe autori şi subiecte încheie acest valoros volum.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie,
Bucureşti

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viața științifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : str. Docenților nr. 20, București 63, Sectorul I.

SZÉCHÉNYI KÖNYVTÁR

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25 × 17,50, 375 p. + 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25 × 17, 50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

1970 DEC

La revue ,,Studii şi cercetări de biochimie'' paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF.25 — DM.20 — Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Calea Victoriei 126, Boîte postale 134 — 135, Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 13, NR. 4, P. 327—436, BUCUREŞTI, DECEMBRIE, 1970

I. P. ,,Informaţia'' — c. 5798

43816

Lei 20. —